

Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar

Universidade do Porto

Mestrado Integrado em Medicina

Tese de Mestrado Integrado em Medicina

Ano letivo 2013/2014

Projeto de Investigação

Hiperatividade vesical
- Papel dos recetores P2Y₆ uroteliais

Aluna: Inês Maria Pacheco Soares Carneiro

Orientador: Professor Doutor Paulo Correia-de-Sá

Porto, Julho de 2014

Dedico esta tese aos meus pais e ao Fábio.

Agradecimentos

Gostaria de deixar um especial agradecimento ao Professor Doutor Paulo Correia-de-Sá, pela aposta no meu trabalho, tendo-me concedido a oportunidade de ingressar os trabalhos neste laboratório, praticamente desde que entrei no ICBAS, no meu 2º ano da faculdade. A sua disponibilidade, orientação técnica e científica e seus ensinamentos seguramente tornaram mais completa a minha formação no curso de Medicina.

Igualmente especial será o agradecimento à Dr.^a Alexandrina Timóteo, o principal elemento afeto a este projeto, por todas as muitas horas de experiências que dedicou, por todos os sábios ensinamentos técnicos e, principalmente, por todo o sacrifício para levar a avante o sucesso do trabalho, mesmo nas alturas de maior cansaço. O seu contributo foi essencial para a realização deste projeto, sendo o interveniente com mais tempo dedicado ao mesmo.

Um agradecimento à Prof^a Doutora Margarida Lima por todos os seus ensinamentos no âmbito da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica, pela sua orientação e disponibilidade e pelo financiamento concedido a este projeto.

Agradeço também à Doutora Fátima Ferreirinha, à Mestre Isabel Silva e Mestre Cátia Vieira, pelos seus contributos inestimáveis diretos na realização de parte deste projeto.

Um agradecimento à Doutora Margarida Duarte-Araújo pelo apoio na manipulação dos animais.

A toda a equipa do Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS, agradeço a forma como me receberam e integraram, pelo companheirismo, apoio técnico e pela disponibilidade diária.

Deixo o meu último agradecimento aos meus pais, que proporcionaram a minha formação em Medicina que culmina com este trabalho, pelo seu apoio incondicional e paciência e a todos os meus amigos que me acompanharam nesta longa jornada.

Preâmbulo

O presente trabalho foi realizado no âmbito da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica (DIIC), com supervisão da Prof^a Doutora Margarida Lima, e decorreu durante os anos letivos de 2012/2013 e 2013/2014, correspondentes ao 5º e 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina, respetivamente.

Este projeto foi desenvolvido no Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia, Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica (UMIB), do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar -Universidade do Porto sob a orientação científica do Professor Doutor Paulo Correia-de-Sá (Professor Catedrático de Farmacologia). O seu principal objetivo foi estudar o papel dos recetores uroteliais de subtipo P2Y₆ na hiperatividade vesical, usando um modelo de ratazana anestesiada *in vivo* complementado com experiências *in vitro* em bexigas isoladas, num contexto em que se pretende investigar novos alvos terapêuticos para o tratamento desta patologia.

Os resultados obtidos neste projeto foram recentemente publicados nos seguintes artigos científicos sujeitos a revisão por pares: Carneiro *et al* (2014). **Activation of P2Y₆ receptors increases the voiding frequency in anaesthetized rats by releasing ATP from the bladder urothelium.**, *Br J Pharmacol*. doi: 10.1111/bph.12711. [Epub ahead of print] [IF: 5.067] (Anexo 1), do qual sou primeira autora, e Timóteo *et al*. (2014), **ATP released via pannexin-1 hemichannels mediates bladder overactivity triggered by urothelial P2Y₆ receptors.** *Biochem Pharmacol*. 87(2):371-9. doi: 10.1016/j.bcp.2013.11.007 [IF: 4.576] (Anexo 2), onde surjo como segunda autora.

A apresentação deste trabalho está organizada em duas partes distintas. Na primeira parte, será exposta a proposta de projeto de investigação elaborada no ano letivo de 2012/2013 e aprovada pelo Gabinete Coordenador da Investigação do Centro Hospitalar do Porto, em Maio de 2013, e pela Comissão de Ética do ICBAS-UP, em Junho de 2013. A segunda parte, apresentará o relatório de execução material, cujos conteúdos se encontram nos dois artigos supracitados. Desta forma, será apresentada uma referência à minha contribuição específica nos dois artigos e um resumo circunstanciado dos resultados obtidos e da sua discussão e as principais conclusões dos dois artigos, realçando apenas o trabalho referente à minha contribuição.

Índice Remissivo

Resumo	6
Abstract	8
PARTE I: PROPOSTA DE PROJETO DE INVESTIGAÇÃO	10
<i>Plano científico</i>	11
I. Introdução	11
II. Enquadramento teórico / Estado da arte	13
1. Síndrome da bexiga hiperativa	13
2. Trato urinário inferior	15
3. Sinalização purinérgica	19
III. Problemas	23
IV. Questões	24
V. Objetivos	24
VI. Intervenientes	24
1. Instituições, Departamentos e Serviços	24
2. Equipa de Investigação	25
VII. Metodologia	27
1. Critérios de revisão da literatura	27
2. Desenho do estudo	28
VIII. Material e Métodos	30
1. Procedimentos técnicos	30
2. Análise estatística	34
3. Fármacos, soluções e equipamentos usados	34
IX. Calendarização	36
X. Indicadores de produção	37
<i>Questões éticas</i>	38
<i>Plano financeiro</i>	39
I. Orçamento	39
II. Financiamento	39
III. Orçamento dos reagentes e material consumível	39
<i>Glossário</i>	41

PARTE II: RELATÓRIO DE EXECUÇÃO	42
<i>Resultados e Discussão</i>	43
I. Artigos publicados.....	43
II. Contribuição da autora para os artigos publicados	43
III. Resumo circunstanciado do contributo da autora para os trabalhos publicados ..	44
<i>Conclusão</i>	50
Referências Bibliográficas	52
Anexos	56

Resumo

A síndrome da bexiga hiperativa é uma disfunção urológica comum, apresentando um mecanismo fisiopatológico que ainda não está totalmente esclarecido. Apesar de na bexiga humana normal, a acetilcolina ser praticamente o único neurotransmissor envolvido na contração muscular, em situações patológicas, a contribuição das purinas, como o ATP, é muito significativa. Desta forma, a neurotransmissão purinérgica tem sido estudada como possível alvo terapêutico em doenças com hiperatividade do detrusor, embora permaneça por esclarecer o papel da transmissão dependente dos nucleótidos de uracilo nestas patologias.

Neste contexto, o presente trabalho teve como principal objetivo a investigação do papel dos recetores ativados por nucleótidos de uracilo, nomeadamente os recetores uroteliais de subtipo P2Y₆, na hiperatividade vesical.

A metodologia deste trabalho englobou experiências *in vivo* e ensaios *in vitro*, utilizando ratas macho da estirpe Wistar. Nas cistometrias realizadas *in vivo* em ratas anestesiadas, o efeito dos fármacos capazes de influenciarem a sinalização purinérgica foi avaliado após a sua infusão intravesical ou intravenosa. Durante estas experiências foram também colhidas amostras do fluido usado para a perfusão da bexiga antes e após a aplicação dos diferentes fármacos, para posterior quantificação dos níveis urinários de ATP. O efeito dos fármacos sobre a atividade espontânea do detrusor isolado foi avaliado *in vitro* através de registos miográficos. A expressão dos recetores purinérgicos na bexiga de ratazana foi avaliada em ensaios de imunofluorescência aplicada à microscopia confocal.

Os resultados deste estudo mostram que, em ratas anestesiadas, a ativação dos recetores P2Y₆ pela aplicação intravesical de UDP (100 µM) ou do seu análogo estável, PSB0474 (100 nM), aumenta (30-40%) a frequência miccional sem afetar a amplitude (A) e a duração (Δt) das contrações vesicais. A ativação dos recetores P2Y₆ uroteliais não alterou a atividade espontânea da bexiga isolada *in vitro*, indicando que a integridade do circuito nervoso é condição essencial para verificar o aumento da atividade vesical. As respostas do UDP (100 µM) e do PSB0474 (100 nM) foram abolidas após a administração intravesical do antagonista seletivo dos recetores P2Y₆, MRS2578 (50 nM). A administração intravenosa do antagonista seletivo dos recetores P2X₃, A317491 (100 nM), preveniu o efeito excitatório do UDP. O MRS2179 (300

nM), antagonista seletivo dos recetores P2Y₁, diminuiu a frequência miccional, embora este efeito tenha ocorrido através de um aumento significativo do Δt das contrações vesicais. A administração de PSB0474 (100 nM) por via intravesical aumentou em cerca de 300% os níveis de ATP na urina; este efeito não foi acompanhado de um aumento significativo da desidrogenase do lactato, um marcador habitual de lesão celular. O aumento da frequência miccional induzida pelo PSB0474 (100 nM), foi abolida pelo inibidor da panexina-1, CBX (1 μ M), quando este fármaco foi instilado no lúmen vesical, mas não quando a CBX (20 μ M) foi aplicada via intravenosa. A redução da permeabilidade dos hemicanais causada pelo inibidor da Rho cinase, H1152 (10 nM), também preveniu o efeito excitatório do PSB0474 (100 nM), enquanto o inibidor da exocitose, Exo-1 (100 μ M), foi inativo. Os ensaios de imunofluorescência aplicada à microscopia confocal mostraram que os recetores P2Y₆ são abundantemente expressos no urotélio e que estes co-localizam com hemicanais de panexina-1.

Os resultados sugerem que a ativação dos recetores P2Y₆ uroteliais provoca um aumento da frequência miccional na ratazana anestesiada, por um mecanismo indireto dependente da libertação de ATP pelo urotélio através de hemicanais de panexina-1. Este mecanismo, que exige a integridade do circuito nervoso vesical, envolve a ativação dos recetores P2X₃ nas fibras nervosas suburoteliais e é, em parte, contrabalançado pela hidrólise do ATP em ADP pelas ectonucleotidases e subsequente ativação de recetores inibitórios do subtipo P2Y₁.

Abstract

Overactive bladder syndrome is a common urologic disorder whose pathophysiological mechanism has not been totally defined so far. Despite the fact that in the normal human bladder acetylcholine is the most relevant neurotransmitter that is responsible for smooth muscle contraction, in pathological conditions the contribution of purines, like ATP, is quite remarkable. Given the circumstances, purinergic neurotransmission has been extensively studied as a putative therapeutic target for diseases occurring with detrusor overactivity, yet there is a gap in our knowledge regarding the role of uracil nucleotides under similar conditions. Therefore, this study was undertaken to investigate the role of UDP-sensitive P2Y₆ receptors in bladder overactivity.

In this study, the effects of UDP and of the selective P2Y₆ receptor agonist, PSB0474, were compared on bladder urodynamics in anaesthetized Wistar rats. Purinergic signal modulators were applied either into the bladder lumen or through a catheter introduced in the jugular vein. Voided fluid was tested for ATP bioluminescence. The isolated urinary bladder was used for *in vitro* myographic recordings to evaluate drug effects on spontaneous bladder activity. Laser scanning confocal microscopy allowed us to evaluate purinoceptors expression in the rat bladder.

Instillation of either UDP (100 μ M) or its stable analogue PSB0474 (100 nM) into the bladder lumen increased by 30-40% the voiding frequency, without affecting the amplitude (A) and duration (Δt) of bladder contractions. UDP- and PSB0474-induced bladder overactivity was prevented by the selective P2Y₆ antagonist, MRS2578. Effects mediated by urothelial P2Y₆ receptors required extrinsic neuronal circuitry as they were not detected in the isolated bladder. Intravenous administration of A317491 (100 nM), a selective P2X₃ receptors antagonist, prevented the excitatory effect of UDP (100 μ M). MRS2179 (300 nM) reduced the voiding frequency, although the effect operated by the P2Y₁ receptor antagonist was due to a significant increase of the Δt of the bladder contractions. The increase in the VF produced by PSB0474 was blocked by inhibitors of pannexin-1 hemichannels, ¹⁰Panx or carbenoxolone, when these drugs were applied inside the bladder lumen but not when they were administered intravenously. Reduction of hemichannels pore permeability with H1152 also prevented PSB0474-induced bladder overactivity, but the exocytosis inhibitor, Exo-1, was

inactive. PSB0474 increased by 3-fold the urinary ATP content, without much affecting the activity of lactate dehydrogenase, a cell damage marker. Confocal microscopy studies demonstrated that P2Y₆ receptors are abundantly expressed in the rat urothelium; these receptors co-localize with pannexin-1 hemichannels.

Data suggest that activation of P2Y₆ receptors causes bladder overactivity in the anaesthetized rat indirectly by releasing ATP from the urothelium via pannexin-1 hemichannels, which subsequently activates P2X₃ receptors on sub-urothelial nerve afferents. Bladder hyperactivity may be partly counteracted by ATP hydrolysis to ADP by ectonucleotidases leading to activation of inhibitory P2Y₁ receptors on cholinergic nerve efferents.

PARTE I: PROPOSTA DE PROJETO DE INVESTIGAÇÃO

Plano científico

I. Introdução

A síndrome da bexiga hiperativa (SBH) é uma disfunção urológica comum, caracterizada por urgência urinária, frequência urinária, incluindo noctúria, com ou sem incontinência de urgência. Um importante achado nos estudos urodinâmicos destes doentes é a presença de contrações involuntárias do detrusor, sugerindo hiperatividade do mesmo. Relativamente às opções farmacológicas de tratamento do SBH, estas estão muito limitadas ao uso de fármacos com ação anti-colinérgica, mais especificamente, com ação anti-muscarínica, tendo-se verificado a ineficácia destes agentes em muitos casos de SBH [1]. Torna-se, desta forma, necessário aumentar as possibilidades farmacológicas de tratamento desta disfunção urológica.

O trato urinário inferior, constituído pela bexiga e pela uretra, tem como principal função o processo de micção, estando este intimamente dependente de um complexo circuito neuronal, cerebral e espinal, que coordena a atividade do músculo liso da bexiga e da uretra. Lesões ou doenças do sistema nervoso podem comprometer o controlo voluntário da micção, causando o reaparecimento do reflexo involuntário e resultando em hiperatividade do detrusor e incontinência de urgência. [2]

Os mecanismos neurofisiológicos envolvidos na contração do detrusor em situações patológicas ainda não estão perfeitamente esclarecidos. Na bexiga humana normal, a acetilcolina (ACh) é praticamente o único neurotransmissor responsável pela contração muscular. Contudo, em situações patológicas, como na cistite intersticial, na obstrução do fluxo ou na bexiga neurogénica, o papel da ACh é consideravelmente menor. [3] A existência de contrações da bexiga, resistentes à atropina, foi descrita em meados do século XX [4], tendo sido apenas, na década de 70 do século passado, identificado o ATP como o mediador envolvido na neurotransmissão não-adrenérgica e não-colinérgica da bexiga. [5] O contributo da sinalização purinérgica é mínimo na bexiga humana normal, mas aumenta para 40% em situações patológicas. [3] Desta forma, ao longo das últimas décadas, a neurotransmissão purinérgica tem sido estudada como possível alvo terapêutico em situações de disfunção urológica com hiperatividade do detrusor.

A neurotransmissão purinérgica está dependente da existência de recetores que reconhecem o ATP e as restantes purinas. Até à data foram identificados quatro subtipos

de recetores P1 (A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3), sete subtipos de recetores P2X (P2X1-7) e oito subtipos de recetores P2Y (P2Y_{1-2/4/6/11-14}). [6] Estes recetores podem ter diferentes expressões consoante os tecidos e o seu estado patológico. [7]

Os recetores P2X1 são os recetores purinérgicos mais abundantes na bexiga humana [8], localizando-se predominantemente no detrusor, e a sua ativação estimula a contração muscular. [9] Experiências realizadas no nosso laboratório em modelos animais corroboram estes resultados, sendo que o uso do NF023, antagonista seletivo dos recetores P2X1, alterou, de maneira significativa, o componente muscular da contração, mas não o componente sensitivo aferente, sugerindo uma localização dos recetores P2X1 no detrusor. [10] Os recetores P2X3 e os recetores P2X2/3 localizam-se, preferencialmente, nas terminações nervosas sensitivas. Estes recetores participam na transmissão de informação referente ao enchimento da bexiga e podem estar envolvidos na diminuição do limiar de excitabilidade, devido à ativação de fibras-C em situações patológicas. [11] Desta forma, os recetores P2X3 têm vindo a ser estudados no sentido de uma possível intervenção farmacológica a nível da dor e da hiperatividade do detrusor.

O envolvimento dos recetores P2Y na fisiopatologia da bexiga não está tão bem estudado como a intervenção dos recetores P2X. A localização dos recetores P2Y₁ no detrusor de rato foi descrita em 1998 [12], tendo sido proposta, mais tarde, uma ação inibitória destes recetores, que pode ser responsável pelo processo de acomodação vesical. [13] A interação entre os recetores P2X2 e P2Y₂ foi descrita nos nervos aferentes da bexiga de rato. A ativação dos recetores P2Y₂, com concentrações relativamente baixas de agonistas, como o UTP, parece não induzir uma corrente intracelular de cálcio significativa, mas facilita as respostas dos recetores ionotrópicos P2X a agonistas purinérgicos. [14] Os recetores P2Y₄ foram identificados no urotélio de gato [15], não tendo sido ainda estudada a ação destes recetores.

O urotélio constitui o epitélio que recobre o trato urinário inferior tendo uma função de barreira, transporte e, mais recentemente reconhecidas, as funções secretória e de sinalização. Ao longo das últimas décadas, vários recetores foram identificados nas células uroteliais, destacando-se os recetores para purinas (P2X e P2Y). [16]

Atualmente, está bem documentada a libertação fisiológica de ATP por parte do urotélio, mediante a ação de estímulos mecânicos, químicos, hipóxia, entre outros agentes. [17] A capacidade secretória do urotélio foi descrita para outros fatores

químicos, para além do ATP, incluindo a substância P, o monóxido de azoto (NO), a ACh, a adenosina e fatores tróficos. [16] A presença concomitante de recetores P2X e P2Y nas células uroteliais, miofibroblastos do suburotélíio e células nervosas, sugere um papel relevante das purinas nas vias de sinalização da bexiga. [18] Vários estudos mostraram que os recetores das células uroteliais apresentam plasticidade em situações patológicas, podendo contribuir para síndromes caracterizadas por hiperatividade e dor vesical.

Os primeiros estudos sobre o papel de recetores do subtipo P2Y₆ na sinalização purinérgica na bexiga propunham uma localização destes recetores nos miofibroblastos suburoteliais, embora a expressão destes recetores na camada urotelial em diversos animais de experiência incluindo no Homem, não seja de menosprezar. [16] A ativação dos recetores P2Y₆ em resposta ao seu ligando natural, a uridina difosfato (UDP), promove um aumento transitório dos níveis de cálcio intracelular. Contudo, o significado fisiológico da sinalização mediada pelos recetores P2Y₆ no controlo da atividade da bexiga requer alguma clarificação. Estudos preliminares realizados no Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS-UP, mostraram que estes recetores são capazes de controlar a libertação de ATP e ACh induzida por estimulação elétrica na bexiga humana, em particular no que respeita à componente urotelial. O presente projeto foi desenhado para investigar o papel dos recetores P2Y₆ e, em geral, dos nucleótidos do uracilo, na sinalização purinérgica entre o urotélíio e a componente neuromuscular da bexiga através da realização de experiências de cistometria *in vivo* no rato anestesiado, com o intuito de investigar novos alvos terapêuticos para o tratamento da bexiga hiperativa.

II. Enquadramento teórico / Estado da arte

1. Síndrome da bexiga hiperativa

A síndrome da bexiga hiperativa (SBH) é uma disfunção urológica comum cuja definição só recentemente foi esclarecida. Em Setembro de 2001, a Sociedade Internacional de Continência (ICS) designou o SBH como uma síndrome sintomática sugestiva de disfunção do trato urinário inferior [1] substituindo o antigo conceito de instabilidade do detrusor, utilizado desde o final dos anos 80. [19]

O quadro clínico do SBH é fundamentalmente sintomático, sendo caracterizado por urgência urinária, frequência urinária, incluindo noctúria, com ou sem incontinência de urgência. Nesta síndrome, os estudos urodinâmicos registam contrações involuntárias do detrusor, sugerindo hiperatividade do mesmo. Contudo, este não é um achado específico de SBH, podendo ocorrer noutras patologias urológicas, como cistites ou neoplasias da bexiga. A coexistência de outra disfunção urológica documentada invalida o diagnóstico de SHB, sendo este último um diagnóstico empírico e de exclusão (Tabela I). [1]

Tabela I. Definição de síndrome da bexiga hiperativa

-
- Síndrome baseada na sintomatologia, caracterizada por urgência urinária, com ou sem incontinência de urgência;
 - Poliaquiúria e noctúria, habitualmente presentes;
 - Sintomas sugestivos de hiperatividade do detrusor;
 - Sem sinais de outra patologia;
-

Fonte: [1]

A SBH é uma disfunção urológica muito prevalente em todo o mundo, responsável por grande morbilidade física, psicológica e social e grandes encargos económicos. O estudo The National Overactive Bladder Evaluation (NOBLE), conduzido por Stewart et al, distinguiu “SBH seca” de “SBH húmida”. A “SHB seca” é caracterizada por quatro ou mais episódios de urgência urinária, nas quatro semanas anteriores, com frequência urinária oito ou mais vezes por dia ou o uso de um ou mais comportamentos de coping para controlar a função vesical. Os mesmos critérios são usados para “SBH húmida”, com adição de três ou mais episódios de incontinência nas passadas quatro semanas e excluindo incontinência de esforço. Os resultados deste estudo demonstraram uma prevalência global de SBH de 16,9% nas mulheres e 16,2% nos homens, com prevalência crescente com o aumento da idade. A “SHB seca” é mais frequente na mulher, sendo a “SHB húmida” mais frequente no homem. [20]

A principal abordagem terapêutica atual da SBH assenta na combinação de medidas comportamentais com terapia farmacológica. Apesar de muitos mecanismos farmacológicos serem teoricamente atrativos e alguns apresentarem já resultados promissores em estudos animais, as opções farmacológicas estão muito limitadas ao uso de fármacos com ação anti-colinérgica, mais especificamente, com ação anti-

muscarínica. Os fármacos com ação anti-muscarínica têm-se revelado ineficazes em muitos casos de SHB podendo ser especuladas várias razões para esta falência farmacológica: a) presença de efeitos laterais severos, o que não permite o uso de doses adequadas; b) erro na prescrição da dose; c) existência de contrações não mediadas pela ACh; d) aumento da concentração de recetores muscarínicos; e) farmacogenómica. [1] Atualmente têm vindo a ser utilizadas outras opções terapêuticas. Estas incluem procedimentos cirúrgicos de neuromodulação, diversão urinária ou desnervação, mas estas técnicas são invasivas e associadas a morbilidade. [1] Torna-se, desta forma, necessário aumentar as possibilidades farmacológicas de tratamento da SHB.

2. Trato urinário inferior

O trato urinário inferior é constituído pela bexiga e pela uretra. A bexiga é um órgão cuja forma, posição, tamanho e relações anatómicas depende do seu conteúdo e do estado das vísceras vizinhas. Em termos de constituição, pode ser dividida em duas partes: o corpo, localizado acima dos orifícios uretrais e a base, constituída pelo trígono e pelo colo vesical. Esta divisão tem particular interesse em termos neurofisiológicos e neurofarmacológicos. Histologicamente, a bexiga é constituída por quatro camadas: o epitélio (denominado por urotélio), a lâmina própria, a muscular própria (ou detrusor) e a serosa. [2]

As funções da bexiga são várias. Primeiro, ela deve ser capaz de armazenar um volume de urina socialmente adequado, tendo por isso de ser altamente complacente, permitindo grandes variações de volume, sem alterações significativas de pressão intraluminal. Segundo, tanto as fibras musculares lisas, como os nervos intrínsecos devem estar protegidos do contacto com a urina, através do urotélio. Terceiro, o esvaziamento da bexiga requer uma ativação síncrona de toda a musculatura lisa do corpo da bexiga. [2]

O processo de micção pode ser visualizado como um complexo circuito neuronal cerebral e espinal, que coordena a atividade do músculo liso da bexiga e da uretra. Estes circuitos operam no modo on-off para alternar as funções do trato urinário inferior entre a função de reservatório e a função de eliminação da urina. Lesões ou doenças do sistema nervoso nos adultos podem comprometer o controlo voluntário da micção, causando o reaparecimento do reflexo involuntário e resultando em hiperatividade do detrusor e incontinência de urgência. [21]

2.1. Controlo neuronal do trato urinário inferior

O trato urinário inferior apresenta uma inervação periférica tripla, envolvendo o sistema nervoso parassimpático, simpático e somático. Cada um destes sistemas apresenta um componente aferente (sensitivo), bem como um componente eferente (motor). [21]

O corpo dos neurónios pré-ganglionares do sistema nervoso parassimpático que inervam a bexiga localizam-se nos núcleos parassimpáticos, na região sagrada da espinal medula (S2-S4) (Figura 1). Nos humanos, a localização dos neurónios pós-ganglionares (que constituem o nervo pudendo) está descrita no detrusor e no plexo pélvico. A neurotransmissão, tanto pré como pós ganglionar, está dependente da ACh e é responsável pela contração da bexiga e relaxamento da uretra. A ACh ativa recetores muscarínicos dos subtipos M2 e M3, presentes nas fibras musculares, sendo que o primeiro subtipo é mais abundante, mas cabe ao segundo subtipo o papel mais importante na contração do detrusor. Os nervos parassimpáticos exercem também um efeito relaxante no músculo liso da uretra, por intermédio da libertação de NO. [2] O ATP co-libertado com a ACh a partir das terminações nervosas pós-ganglionares também desempenha um papel na contração do detrusor, principalmente em situações patológicas. [3]

O sistema nervoso simpático que inerva a bexiga tem representação nos segmentos lombares mais rostrais da espinal medula (T11-L2) e é responsável pelo relaxamento do corpo da bexiga e contração da base da bexiga e uretra (Figura 2). As vias de sinalização simpáticas periféricas da bexiga são complexas: das cadeias ganglionares simpáticas, a sinalização passa para os gânglios mesentéricos inferiores e depois, via nervo hipogástrico, até aos gânglios pélvicos. A neurotransmissão pré-ganglionar é mediada pela ACh e a pós-ganglionar pela NA. As terminações nervosas simpáticas estão presentes na uretra, na base e trígono da bexiga e nas terminações nervosas pós-ganglionares parassimpáticas no gânglio pélvico. O fenómeno da contração depende da ativação dos recetores $\alpha 1$ - adrenérgicos, estando o relaxamento do detrusor dependente da ativação de recetores $\beta 2$ e $\beta 3$ -adrenérgicos. [2]

A inervação somática é responsável pela contração do músculo estriado do esfíncter uretral externo e dos músculos do pavimento pélvico (Figura 3). O corpo dos neurónios motores eferentes está localizado nos segmentos S2-S4 da medula espinal, sendo que os seus axónios motores integram o nervo pudendo. A neuro transmissão está

a carga da ACh, a qual ativa receptores nicotínicos no músculo estriado causando contração muscular e contribuindo para o processo de armazenamento de urina na bexiga. [21]

A sinalização aferente do trato urinário inferior está dependente dos nervos pélvico, hipogástrico e pudendo, os quais veiculam a informação sensorial até ao segmento lombossagrado da espinal medula. A componente aferente do nervo pélvico, composto por fibras-A δ e fibras-C, monitoriza o volume da bexiga durante a fase de enchimento e a amplitude das contrações da bexiga durante a micção. As fibras-A δ mielinizadas, com localização predominante na camada muscular lisa, respondem a forças de distensão e transmitem a sensação de preenchimento vesical. As fibras-C não mielinizadas localizam-se no detrusor, na camada sub-urotelial, na mucosa e estão adjacentes às próprias células uroteliais. As fibras-C, tal como as fibras-A δ , respondem a forças de distensão, funcionando como sensores de volume. Para além desta função, intervêm também na nocicepção associada ao sobre preenchimento vesical ou à presença de substâncias irritantes, no lúmen vesical. Estas fibras são ativadas por vários neurotransmissores e mediadores químicos libertados pelo detrusor e pelo urotélio, incluindo o ATP, várias neurocininas, o fator de crescimento nervoso (NGF), entre outros. [2]

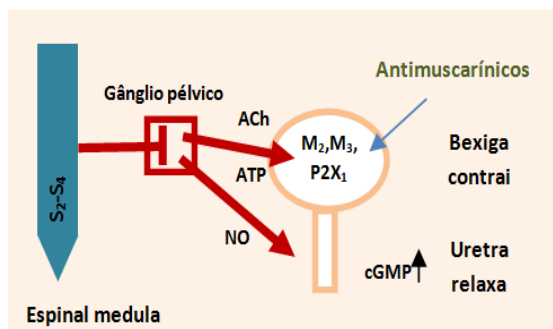


Figura 1. Parassimpático (nervo pudendo): os terminais nervosos pós ganglionares parassimpáticos libertam ACh e outras substâncias como o ATP, os quais modulam a contração vesical. Adaptado de [21].

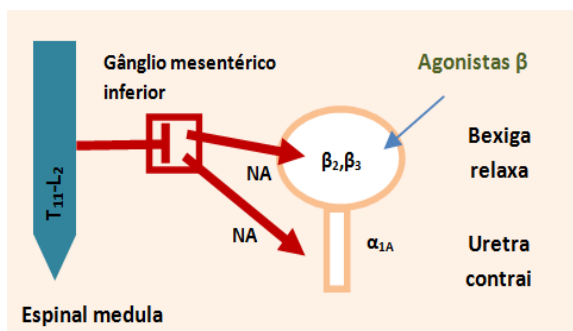


Figura 2. Simpático (nervo hipogástrico): os terminais nervosos pós ganglionares simpáticos libertam NA, a qual relaxa o corpo vesical e contrai a base da bexiga e a uretra. Adaptado de [21].

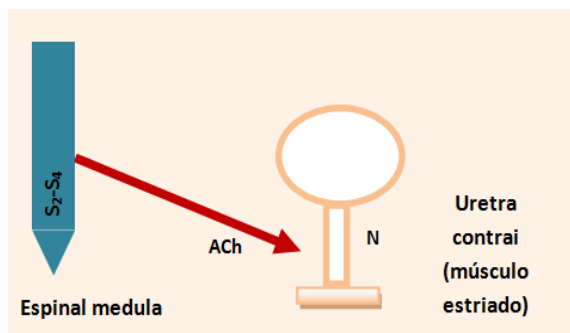


Figura 3. Somático (nervo pudendo): os terminais nervosos pós ganglionares parassimpáticos libertam ACh a qual induz contração da uretra, através da ação de recetores muscarínicos no músculo estriado. Adaptado de [21].

2.2. Urotélio

O urotélio constitui o epitélio que recobre o trato urinário inferior tendo a função de barreira, transporte e, mais recentemente reconhecidas, funções secretórias e de sinalização. Este epitélio é composto por três camadas: i) camada basal, que interage com a matrix extracelular do suburotélio, com função de suporte estrutural; ii) camada intermédia; e iii) camada apical ou das células “umbrella”, composta por grandes células hexagonais, por vezes multinucleadas, que apresentam uma permeabilidade muito baixa à urina e a agentes patogénicos. A função desta última camada está dependente da existência de junções apertadas (tight junctions) e de uroplaquinas, a cobrir a sua parte apical. [16]

A função barreira do urotélio está dependente de vários fatores: i) baixa mobilidade das cadeias alifáticas das moléculas de fosfolípidos [22]; ii) secreção de lípidos com baixa mobilidade para a superfície apical das células [23]; e iii) a presença de junções apertadas, que diminuem o movimento de iões e solutos entre as células e de uroplaquinas, na membrana apical, que reduzem a permeabilidade a pequenas moléculas (e.g. água, ureia, protões). [24] Apesar do urotélio funcionar como uma barreira ao fluxo de iões e solutos, fatores como o pH, o trauma mecânico ou químico, a infeção bacteriana, a cistite intersticial ou a lesão na espinal medula, podem modificar esta propriedade. [25]

A capacidade secretória do urotélio face a estímulos mecânicos e químicos foi descrita, nas últimas décadas, para vários fatores químicos incluindo a substância P, o monóxido de azoto (NO), o ATP, a ACh, a adenosina e fatores tróficos. Estudos histológicos comprovaram a existência de muitos terminais sensoriais na região do urotélio e suburotélio, sendo que a proximidade destes nervos aferentes com o urotélio pode implicar uma interação entre ambos, na sensação de preenchimento vesical. Desta forma, o urotélio funciona como mecano e nociceptor, tal como os nervos aferentes. [16]

Ao longo das últimas décadas, vários recetores foram identificados nas células uroteliais, destacando-se os recetores para purinas (P2X e P2Y), noroarenalina (NA) (α e β), ACh (muscarínicos e nicotínicos), bradicinina (B1,2), fatores de crescimento neuronal e outras substâncias (TRPV 1,2,4, TRPA1,8). [16]

Uma das substâncias libertadas pelo estiramento celular do urotélio a ser, pela primeira vez, identificada foi o ATP. A concomitante presença de recetores P2X e P2Y nas células uroteliais, miofibroblastos do suburotélio e células nervosas, sugerem um papel relevante desta molécula nas vias de sinalização da bexiga. A ativação de recetores P2X e P2Y pelo ATP libertado durante a distensão da bexiga, potencia a sua própria libertação bem como a libertação de outros mediadores uroteliais, por um mecanismo autócrino. Em situações patológicas, a ativação continuada da população de nervos suburoteliais que expressam recetores P2X3 ou P2X2, pelo ATP libertado induz sensações de dor e de limitação de volume, sendo este o principal responsável pelas alterações na atividade da bexiga. [18] Vários estudos sugerem que os recetores das células uroteliais apresentam plasticidade em situações patológicas, podendo contribuir para síndromes caracterizadas por hiperatividade e dor vesical.

3. Sinalização purinérgica

3.1. ATP e neurotransmissão

No início dos anos 60 do século passado, Burnstock e os seus colaboradores realizaram experiências de estimulação nervosa do músculo liso da teania coli do porquinho da Índia, na presença de atropina e bretílio, agentes que bloqueiam a neurotransmissão colinérgica e adrenérgica, respetivamente. Ao contrário do que esperavam, os resultados revelaram uma rápida hiperpolarização e relaxamento do músculo liso. [26] Da interpretação destes resultados surpreendentes surgiu a hipótese da existência de uma neurotransmissão inibitória, independente da sinalização colinérgica e adrenérgica, designada, deste então, por transmissão não colinérgica e não adrenérgica (NANC). [27]

Descoberta a existência da transmissão NANC, várias substâncias, incluindo aminoácidos, monoaminas e neuropeptídeos foram propostas como os mediadores envolvidos neste novo tipo de neurotransmissão. Baseados numa evidência já considerável do papel extracelular dos nucleótidos de purinas, nomeadamente do ATP e da adenosina, no coração, vasos sanguíneos [28] e nos gânglios autonómicos [29],

Burnstock estudou o ATP como possível substância envolvida na transmissão NANC. É desta forma que, em 1972, é apresentada a teoria dos nervos purinérgicos. [5] O facto de o ATP ser visto, até então, como moeda energética interveniente em funções exclusivamente intracelulares e dada a sua ubiquidade, originou, inicialmente, uma grande resistência à aceitação desta teoria. [30]

Em 1976, surge a hipótese da co-transmissão de ATP com outras substâncias, como a NA, a partir de nervos simpáticos. Foi, desta forma, deposto o Principio de Dales: um nervo só liberta um neurotransmissor, começando uma intensa investigação neste âmbito. Hoje em dia, é perfeitamente reconhecida a libertação conjunta de vários neurotransmissores, tanto a nível do sistema nervoso central como periférico, tendo já sido identificada a co-transmissão de ATP com NA, ACh, ácido γ -aminobutírico (GABA), dopamina e serotonina. [31]

3.2. Recetores purinérgicos

A apresentação da teoria dos nervos purinérgicos tinha subjacente a existência de recetores para as purinas. Desta forma, em 1978, foi proposta uma nomenclatura para distinguir os recetores seletivos para a adenosina, denominados de P1, e antagonizados pelas metilxantinas, dos recetores seletivos para o ATP/ADP, denominados P2. [32] Estudos subsequentes identificaram os recetores P2 como pós-juncionais enquanto que os recetores P1 estariam envolvidos numa resposta de autorregulação pré-juncional. Posteriormente, estudos farmacológicos permitiram subdividir a família dos recetores P2 em duas grandes subfamílias: recetores P2X e recetores P2Y, existindo diferenças estruturais e de mecanismo de transdução de sinal associados a estas subfamílias. [30] Até à data foram identificados quatro subtipos de recetores P1 (A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3), sete subtipos de recetores P2X (P2X₁₋₇) e oito subtipos de recetores P2Y (P2Y_{1-2/4/6/11-14}). [6].

Os recetores P2X são ionotrópicos sendo que a expressão dos seus subtipos depende dos tecidos e pode estar alterada em certas patologias, com aumento ou diminuição da sua expressão. Neste trabalho os recetores P2X₃ adquirem maior relevo, estando preferencialmente descrita a sua expressão nos terminais nervosos centrais e periféricos de fibras C não mielinizadas e aferentes sensitivos. [7] Estes recetores são preferencialmente ativados pelo ATP.

Os recetores P2Y são metabotrópicos, com acoplamento à proteína G, sendo que neste trabalho serão estudados os subtipos P2Y₁ e P2Y₆. O recetor P2Y₁ reconhece

preferencialmente o ADP e a sua expressão foi descrita nas células epiteliais e endoteliais, plaquetas, células do sistema imunitário, osteoclastos e cérebro. [6] Os recetores P2Y₆, recentemente implicados na atividade fagocitária [33], têm por principais ligandos os nucleótidos de uridina (UDP> UTP>> ATP). A sua expressão foi descrita nas células epiteliais das vias aéreas e intestinais, placenta, células T, timo e micróglia. [6]

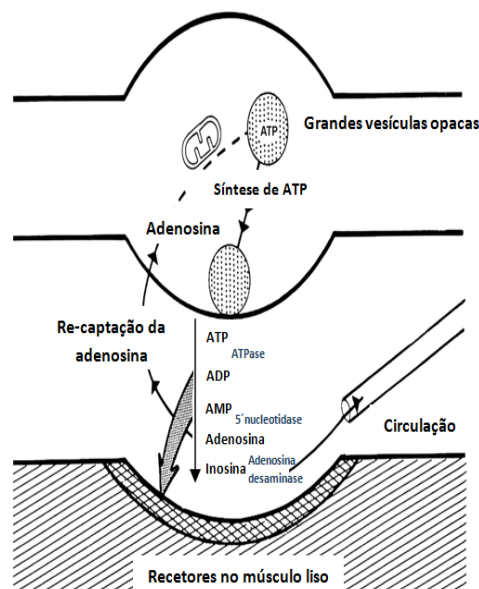
3.3. Liberação e metabolização dos nucleótidos de purina

Durante muitos anos acreditou-se que a origem do ATP, que atuava nos recetores purinérgicos, seria proveniente da lesão ou morte celular (com exceção do mecanismo de exocitose vesicular reconhecido para as células nervosas). Hoje em dia, está perfeitamente documentada a liberação de ATP, em condições fisiológicas, por ação de estímulos mecânicos, químicos, hipoxia, entre outros agentes. [17]

O mecanismo de liberação do ATP por células não excitáveis encontra-se atualmente em estudo, sendo propostos vários mecanismos: exocitose vesicular, transportadores ABC, hemi-canais de conexinas e panexinas, canais de axi-ões e recetores P2X7. [31] (Figura 4).

A metabolização extracelular do ATP em ADP e AMP ocorre pela via das ectonucleotidases, estando incluídas nesta cascata enzimática as ectonucleotidases trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDases), ectonucleótido pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPPs), ecto-fosfatase alcalina e ecto-5' nucleotidase/CD73. [34] A distribuição diferencial nos tecidos e a sua preferência por determinado substrato influencia a contribuição destas enzimas para a modulação purinérgica. [35]

Figura 4. Hipótese de neurotransmissão purinérgica (1972). A transmissão neuromuscular purinérgica é evidenciada na síntese, armazenamento, liberação e inativação de ATP. O ATP, armazenado em vesículas nos terminais nervosos, é libertado por exocitose e atua nos recetores pós-juncionais do ATP, no músculo liso. O ATP é hidrolizado pelas ATPases e pela 5'-nucleotidase a adenosina, a qual é reabsorvida pelos terminais nervosos, de forma a ressintetizar e reincorporar ATP em vesículas. Adaptado de [5].



3.4. Sinalização purinérgica no trato urinário inferior

A existência de contrações da bexiga, resistentes à atropina, aquando da estimulação nervosa parassimpática foi descrita em meados do século XX. [4] Mais tarde, o ATP foi identificado como o mediador envolvido no processo excitatório não-colinérgico da bexiga. [5]

Na bexiga humana normal, a acetilcolina é praticamente o único neurotransmissor responsável pela contração muscular, mas apenas aproximadamente 3% das contrações são mediadas por purinas. Contudo, em situações patológicas, como cistite intersticial, obstrução do fluxo ou bexiga neurogénica, a contribuição purinérgica sobe para cerca de 40%. [3] O aumento das contrações resistentes à atropina, em certas patologias da bexiga pode ocorrer por: aumento da sensibilidade do detrusor ao ATP, aumento da libertação de ATP por parte dos neurónios motores ou diminuição da hidrólise do ATP, na junção neuromuscular. [16]

Os recetores P2X1 são os recetores purinérgicos mais abundantes na bexiga humana, como comprovado por estudos quantitativos de mRNA. [8] Estes recetores localizam-se, predominantemente, no detrusor e a sua ativação conduz a um influxo de cálcio, através dos canais de cálcio tipo L, iniciando uma contração muscular. [9] Experiências realizadas no nosso laboratório em modelo animal corroboram estes resultados, sendo que o uso do NF023, antagonista seletivo dos recetores P2X1, alterou preferencialmente o componente muscular da contração, mas não o componente sensitivo aferente, sugerindo uma localização dos recetores P2X1 no detrusor. [10]

Os recetores P2X3 homomultiméricos e os recetores P2X2/3 heteromultiméricos localizam-se, predominantemente, nas terminações nervosas sensitivas.[36] A libertação de ATP, a partir das células uroteliais ativa os recetores P2X3 e P2X2/3, localizados nas terminações nervosas aferentes suburoteliais, desencadeando uma ação dupla. Através da estimulação de fibras com baixo limiar de ativação, é iniciada uma contração vesical, enquanto a estimulação de fibras com elevado limiar de ativação intervém na nocicepção. [37] Estes recetores estão envolvidos na transmissão de informação referente ao enchimento da bexiga e podem estar envolvidos na diminuição do limiar de excitabilidade, devido à ativação de fibras-C em situações patológicas. [11] Desta forma, os recetores P2X3 têm vindo a ser estudados no sentido de uma possível intervenção farmacológica a nível da dor e da hiperatividade do detrusor.

O envolvimento dos recetores P2Y na fisiopatologia da bexiga não está tão bem estudado como a intervenção dos recetores P2X. A localização dos recetores P2Y₁ no detrusor de rato foi descrita em 1998 [12], sendo mais tarde proposta uma ação inibitória destes recetores, intervindo no processo de acomodação vesical. [13] A interação entre os recetores P2X₂ e P2Y₂ foi descrita nos nervos aferentes da bexiga de rato. A ativação dos recetores P2Y₂, com concentrações relativamente baixas de agonistas, como o UTP, parece não induzir uma corrente intracelular de cálcio significativa, mas facilita as respostas dos recetores ionotrópicos P2X a agonistas purinérgicos. [14] Os recetores P2Y₄ foram identificados no urotélio de gato [15], não tendo sido ainda estudada a ação destes recetores.

Os primeiros estudos sobre o papel de recetores de subtipo P2Y₆ na sinalização purinérgica na bexiga propunham uma localização destes recetores nos miofibroblastos suburoteliais, embora a expressão destes recetores na camada urotelial em diversos animais de experiência incluindo o Homem, não seja de menosprezar. [16] A ativação dos recetores P2Y₆ em resposta ao seu ligando natural, o UDP, promove um aumento transitório dos níveis de cálcio intracelular. Contudo, o significado fisiológico da sinalização mediada pelos recetores P2Y₆ no controlo da atividade da bexiga requer alguma clarificação. Estudos preliminares realizados no Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS-UP, mostraram que estes recetores são capazes de controlar a libertação de ATP e ACh induzida por estimulação elétrica na bexiga humana, em particular no que respeita à componente urotelial. O presente projeto foi desenhado para investigar o papel dos recetores P2Y₆ e, em geral, dos nucleótidos do uracilo, na sinalização purinérgica entre o urotélio e a componente neuromuscular da bexiga através da realização de experiências de cistometria *in vivo* no rato anestesiado, com o intuito de investigar novos alvos terapêuticos para o tratamento da bexiga hiperativa.

III. Problemas

A síndrome da bexiga hiperativa apresenta um mecanismo fisiopatológico ainda não totalmente conhecido. Apesar da transmissão purinérgica dependente do ATP e seus metabolitos, na bexiga, já se encontrar perfeitamente bem estudada, a transmissão mediada por nucleótidos de uracilo continua por esclarecer. Sendo que já foi comprovada a utilidade da intervenção farmacológica na transmissão mediada pelo ATP

em doentes com hiperatividade do detrusor, especula-se a pertinência da intervenção na possível transmissão veiculada pelos nucleótidos de uracilo.

IV. Questões

- Qual o papel dos nucleótidos de uracilo na neurotransmissão vesical?
- Os recetores de subtipo P2Y₆ terão expressão significativa na bexiga? Em que componente (s) histológico (s)?
- Caso os recetores do subtipo P2Y₆ estejam presentes na bexiga, que funções medeiam?
- Existirá interligação entre a sinalização mediada pelo ATP e a possível sinalização dependente dos nucleótidos de uracilo, na bexiga?
- Quais os mecanismos envolvidos na libertação de ATP por parte das células uroteliais?
- A manipulação farmacológica destes recetores poderá ter implicações terapêuticas?

V. Objetivos

O presente trabalho está centrado na investigação do papel de recetores de subtipo P2Y₆ uroteliais, na hiperatividade vesical, usando um modelo animal *in vivo*. Os parâmetros urodinâmicos, avaliados numa situação de hiperatividade vesical, e numa situação de manipulação farmacológica com agonistas/antagonistas de recetores purinérgicos presentes no tecido vesical, serão usados na investigação de novos alvos terapêuticos a médio prazo para o tratamento desta patologia.

VI. Intervenientes

1. Instituições, Departamentos e Serviços

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS) da Universidade do Porto (UP), (ICBAS/UP), Departamento de Imuno-Fisiologia e Farmacologia (IMFF), Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia (LFN).

2. Equipa de Investigação

2.1. Constituição

Aluna: Inês Soares Carneiro: Aluna da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica (DIIC) do Curso de Mestrado Integrado em Medicina (MIM) do ICBAS/UP.

Orientadores do projeto: Paulo Correia-de-Sá: Médico, Professor Catedrático do ICBAS/UP, Regente das Unidades Curriculares de Farmacologia I e II, Diretor do Departamento de Imuno-Fisiologia e Farmacologia (IMFF), Investigador Principal do Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS/UP (Orientador).

Supervisor da DIIC: Margarida Lima: Médica, Imunohemoterapeuta, Assistente Hospitalar Graduada, SHC do HSA/CHP; Professora Auxiliar Convidada do ICBAS/UP; Regente da DIIC.

Outros investigadores: Alexandrina Timóteo, Licenciada em Ciências Farmacêuticas, Técnica Superior no Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS/UP. Fátima Ferreirinha, Licenciada em Biologia, Doutorada em Ciências Biomédicas pelo ICBAS/UP, Técnica Superior no Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS/UP. Isabel Silva, Licenciada e Mestre em Genética e Biotecnologia pela UTAD, Estudante de Doutoramento em Ciências Biomédicas no ICBAS/UP, Bolseira de Investigação no Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS/UP. Cátia Vieira, Licenciada em Biologia pela Universidade da Madeira, Mestre em Ciências Químicas e das Biomoléculas ESTSP, Estudante de Doutoramento em Ciências Biomédicas no ICBAS/UP, Bolseira de Doutoramento pela FCT no Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS/UP.

2.2. Funções e responsabilidades

A conceção e elaboração da proposta e a execução do projeto são da responsabilidade da aluna.

Os orientadores acompanharão o aluno na elaboração de proposta, na execução do projeto e na análise e interpretação dos resultados.

A regente da DIIC supervisionará todas as fases do projeto, desde a sua conceção até à apresentação dos resultados, passando pela sua execução e análise/interpretação dos dados.

Os restantes investigadores colaborarão em aspetos específicos do projeto, conforme especificado adiante.

2.3. Tempo dedicado ao projeto (Tabela II)

Nome e apelido	Função	% Tempo de dedicado ao projeto	Nº de meses	Pessoas * Mês
Inês Carneiro	Aluna	10	22	2,20
Paulo Correia-de-Sá	Orientador	2,5	22	0,55
Margarida Lima	Supervisora	2,5	22	0,55
Alexandrina Timóteo	Investigadora	80	22	17,6
Fátima Ferreirinha	Investigadora	40	1	0,4
Isabel Silva	Investigadora	40	3	1,2
Cátia Vieira	Investigadora	40	0,75	0,3
Total				22,8

2.4. Condições e motivações para a realização do estudo

Capacidades instaladas e recursos disponíveis

Todas as etapas da investigação vão decorrer no Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS/UP. Este laboratório dispõe de todos os equipamentos necessários para a realização dos estudos que integram este projeto, assim como de uma equipa constituída por profissionais especializados, com uma vasta experiência nesta área de investigação.

Mérito da equipa de investigação

No Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS/UP têm sido desenvolvidos ao longo dos últimos anos numerosos projetos de investigação na área da Farmacologia e da Urologia, nomeadamente no que respeita ao papel da

neurotransmissão purinérgica e dos recetores que reconhecem o ATP e as restantes purinas em diversas situações patológicas, incluindo a disfunção vesical. Destes projetos resultaram numerosos artigos publicados em revistas científicas internacionais.

O orientador do projeto, Prof. Doutor Paulo Correia-de-Sá, tem assumido a liderança científica desta linha de investigação. Este investigador é também o Coordenador da Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica (UMIB/ICBAS/UP), uma Unidade de Investigação reconhecida pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) e pelo grupo de investigação “Farmacologia e Neurociências” integrado nesta unidade.

Motivações pessoais para a realização do estudo

Enquanto estudante de medicina, próximo da conclusão da minha formação médica, proponho-me a realizar este estudo como forma de adquirir conhecimentos sobre a metodologia de investigação científica. O presente estudo servirá ainda como dissertação de tese de mestrado, do curso de Mestrado Integrado em Medicina.

O estudo aqui proposto versa um problema médico muito frequente na população, com evidente impacto na qualidade de vida dos doentes. Apesar de se tratar de um projeto de investigação básica, a metodologia utilizada, nomeadamente o facto das experiências se realizarem *in vivo*, possibilita uma maior proximidade com a situação clínica. Desta forma, considero que este projeto será uma mais-valia para a minha formação médica.

VII. Metodologia

1. Critérios de revisão da literatura

As ferramentas eletrónicas usadas para a consulta foram o PubMed e o B-On.

Para a revisão bibliográfica do tema foram usados artigos de revisão (dada preferência a artigos com publicação mais recente, sem preferência de autor) e artigos originais (sem preferência de data de publicação ou autor). Os artigos consultados, todos em língua inglesa, apresentavam conteúdos relacionados com uma das seguintes palavras-chave: síndrome da bexiga hiperativa, ATP, recetores purinérgicos, UTP, UDP. Outras fontes de informação incluem artigos publicados pela equipa de investigação, bem como trabalhos preliminares, ainda não publicados.

2. Desenho do estudo

2.1. Tipo de estudo:

Estudo de investigação laboratorial, nacional e institucional, de carácter analítico, experimental, Investigação fundamental de âmbito laboratorial.

2.2. Tarefas associadas ao projeto

Lista de tarefas:

Durante a execução do projeto estão previstas as seguintes tarefas (**Tabela III**):

Nº da tarefa	Designação da tarefa	Data de início	Data de conclusão
1	Cistometria em ratazanas <i>in vivo</i> e eletrofisiologia da atividade do nervo pélvico.	02/09/2013	29/03/2014
2	Mecanismos reguladores da libertação de ATP a partir das células uroteliais e terminais nervosos eferentes.	28/10/2013	31/01/2014
3	Registos miográficos em bexiga de ratazana para caracterização funcional de recetores purinérgicos.	01/04/2014	19/04/2014
4	Estudos de co-localização de recetores P2X e P2Y em bexiga de ratazana.	30/09/2013	01/11/2013

Descrição das tarefas

Tarefa 1: Cistometria em ratazanas *in vivo* e eletrofisiologia da atividade do nervo pélvico.

Duração: 7 meses; Data prevista para o início: 02/09/2013; Data prevista para a conclusão: 29/03/2014

Instituições, Departamentos e Serviços: ICBAS/UP, DIFF, LFN.

Objetivos: Estudar, através de ensaios farmacológicos, a função de vários subtipos de recetores purinérgicos, na fisiopatologia da bexiga e investigar os mecanismos associados a libertação de ATP, a partir das células uroteliais.

Descrição: Ver: Material e métodos, Cistometria em ratazana *in vivo*.

Investigadores envolvidos: Paulo Correia-de-Sá, Alexandrina Timóteo e Inês Carneiro.

Funções e responsabilidades dos investigadores: Paulo Correia-de-Sá: Planeamento de protocolos experimentais; Alexandrina Timóteo: Realização das experiências *in vivo* e planeamento de protocolos experimentais; Inês Carneiro: Auxílio na realização das experiências *in vivo* e contributo no planeamento teórico das experiências.

Tarefa 2: Mecanismos reguladores da libertação de ATP a partir das células uroteliais e terminais nervosos eferentes.

Duração: 3 meses; Data prevista para o início: 28/10/2013; Data prevista para a conclusão: 31/01/2014

Instituições, Departamentos e Serviços: ICBAS/UP, DIFF, LFN.

Objetivos: Identificação de possíveis mecanismos reguladores da libertação de ATP a partir das células uroteliais e terminais nervosos eferentes.

Descrição: Ver: Material e métodos, Ensaio de bioluminescência luciferina-luciferase.

Investigadores envolvidos: Paulo Correia-de-Sá, Alexandrina Timóteo, Isabel Silva e Inês Carneiro.

Funções e responsabilidades dos investigadores: Paulo Correia-de-Sá: Planeamento de protocolos experimentais; Alexandrina Timóteo: Realização das experiências *in vivo* e planeamento de protocolos experimentais; Isabel Silva: Realização do ensaio de bioluminescência luciferina-luciferase para quantificação dos níveis urinários de ATP e contributo no planeamento teórico das experiências; Inês Carneiro: Auxílio na realização das experiências *in vivo* e contributo no planeamento teórico das experiências.

Tarefa 3: Registos miográficos em bexiga de ratazana para caracterização funcional de recetores purinérgicos.

Duração: 3 semanas; Data prevista para o início: 01/04/2014; Data prevista para a conclusão: 19/04/2014

Instituições, Departamentos e Serviços: ICBAS/UP, DIFF, LFN.

Objetivos: Ensaios farmacológicos para estudo da influência de diversas soluções nas contrações espontâneas da bexiga.

Descrição: Ver: Material e métodos, Registos miográficos em bexiga de ratazana.

Investigadores envolvidos: Paulo Correia-de-Sá, Cátia Vieira e Inês Carneiro.

Tarefa 4: Estudos de co-localização de recetores P2X e P2Y em bexiga de ratazana.

Duração: 1 mês; Data prevista para o início: 30/09/2013; Data prevista para a conclusão: 01/11/2013

Instituições, Departamentos e Serviços: ICBAS/UP, DIFF, LFN.

Objetivos: Verificar a localização preferencial dos recetores em estudo, nos diferentes componentes histológicos da bexiga.

Descrição: Ver: Material e métodos, Imunofluorescência em microscopia confocal

Investigadores envolvidos: Paulo Correia-de-Sá, Fátima Ferreirinha e Inês Carneiro.

Funções e responsabilidades dos investigadores: Paulo Correia-de-Sá: Planeamento de protocolos experimentais; Fátima Ferreirinha: Preparação das amostras de bexiga e leitura em microscópio confocal de imunofluorescência; Inês Carneiro: Contributo no planeamento teórico das experiências.

VIII. Material e Métodos

1. Procedimentos técnicos

1.1. Animais

Neste trabalho serão utilizadas ratazanas macho Wistar (Charles River, Barcelona, Espanha) com peso compreendido entre os 300 e 450g. Os animais receberão água e comida *ad libitum* e serão mantidos a uma temperatura constante (21°C), com ciclo regular de luminosidade / obscuridade. O tratamento dos animais e os procedimentos experimentais seguirão as recomendações do International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS). Todas as precauções serão tomadas com o intuito de minimizar o sofrimento animal, bem como reduzir o número de animais utilizados.

1.2. Cistometria em ratazana *in vivo*

Durante estas experiências, as ratazanas serão anestesiadas com uretano numa dose 1,2g/Kg, através de uma injeção intraperitoneal. A anestesia será mantida ao longo da experiência através da administração de doses de 0,1 g/Kg, segundo as exigências do plano anestésico. O animal permanecerá toda a experiência sobre uma placa de aquecimento, que permitirá a manutenção da sua temperatura corporal perto dos 37°C.

O procedimento cirúrgico iniciar-se-á com a execução de uma traqueostomia, sendo inserido um cateter na traqueia, para controlo da via aérea e monitorização da frequência respiratória ao longo da experiência. Seguidamente, de forma a manter o animal hidratado, proceder-se-á à cateterização da veia jugular, através da qual será infundido soro fisiológico (à taxa de 0,04 mL/min por intermédio de uma seringa perfusora automática) durante toda a experiência. Posteriormente proceder-se-á a uma laparotomia suprapúbica para se identificar a bexiga e, através de uma incisão na cúpula, inserir-se-á uma cânula de três vias fixada com fio de seda 3/0. Uma das vias será conectada a um transdutor de pressão com vista à determinação das pressões intravesicais, a segunda será utilizada para influxo e a terceira para efluxo de soluções na bexiga.

A frequência respiratória, a pressão intravesical, a derivação II do electrocardiograma e, em determinadas experiências, a atividade do nervo pélvico, serão registadas continuamente através de um sistema informatizado de aquisição de dados PowerLab (Chart 5, v.4.2 software; AD Instruments, USA), para posterior análise e quantificação. Através da cânula introduzida na bexiga será infundido soro fisiológico (0.04ml/min), por intermédio de um seringa infusora automática, de forma a provocar reflexos miccionais repetidos e com características estáveis ao longo do tempo (Figura 5). Do perfil de variação da pressão intravesical serão obtidos quatro parâmetros cistométricos: o intervalo entre contrações (intercontraction interval, ICI), a variação de pressão até ser evocado um reflexo miccional (pressure threshold, PTh), a amplitude das contrações (A) e a duração de cada contração (Δt) (Figura 6).

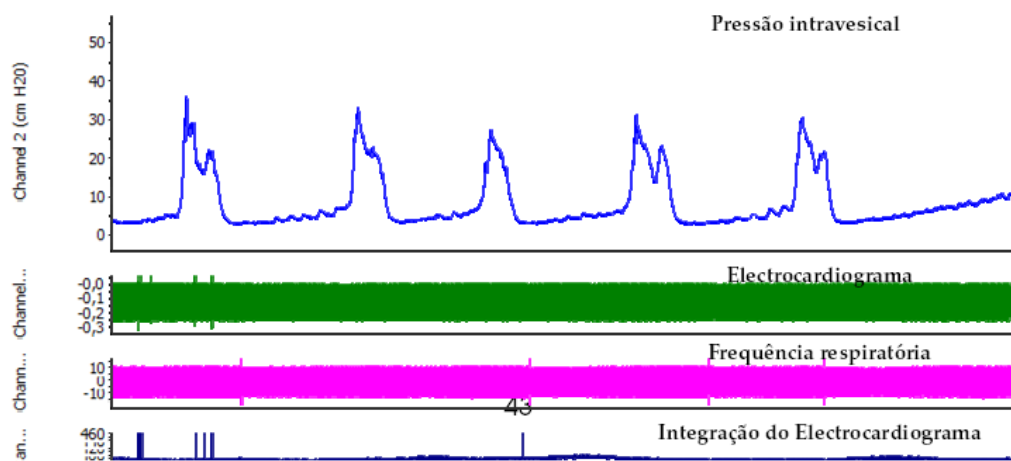
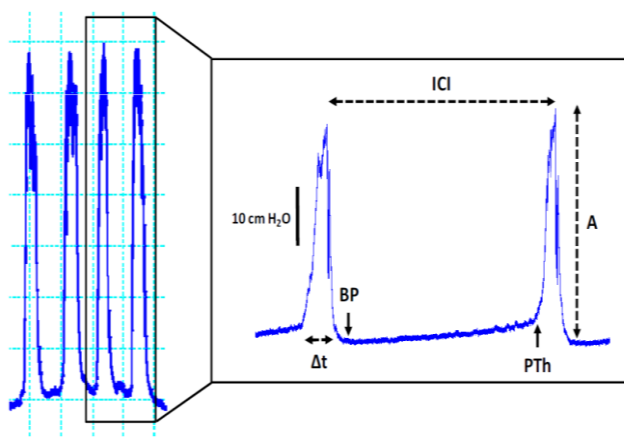


Figura 5. Exemplo de registo dos parâmetros cistométricos obtidos ao longo de parte de uma experiência.



ICI: Intervalo entre contrações;

PTh: Variação de pressão até ser evocado um reflexo miccional;

A: Amplitude das contrações;

Δt : Duração de cada contração;

Figura 6. Caraterização dos parâmetros cistométricos obtidos ao longo de parte de uma experiência.

Serão utilizadas duas vias para a administração de fármacos: endovenosa e intravesical. Através da veia jugular cateterizada será possível administrar fármacos, pretendendo-se com isto que estes atinjam a bexiga e outras estruturas (e.g. nervos periféricos, sistema nervoso central) por via sistémica; a administração intravesical terá como objetivo observar os efeitos dos fármacos sobre o urotélio vesical e, eventualmente, sobre as estruturas subjacentes (e.g. nervos sensitivos suburoteliais, miofibroblastos). Para os fármacos administrados via endovenosa, a concentração será expressa em dose (g/Kg peso vivo) e a sua preparação será realizada em soro fisiológico. Para os fármacos administrados por via intravesical, a concentração será expressa em molaridade (M) e estes serão preparados em soro fisiológico ou em UDP (100 μ M) ou PSB0474 (100 nM), dependendo do objetivo pretendido, i.e. a

investigação do efeito numa situação controlo (preparação em soro fisiológico) ou numa situação de hiperatividade vesical.

No protocolo para investigação da ação intravesical de fármacos, após um período inicial de 60 minutos de estabilização (sistema de três vias aberto) com soro fisiológico, a via de saída da cânula será fechada, de forma a evocar os reflexos miccionais. Obtido um padrão controlo das contrações para cada animal, durante 60-90 minutos, será mudada a solução de infusão intravesical e o efeito do fármaco será estudado a partir de cerca de 60 minutos após essa mudança. O protocolo de administração endovenosa de fármacos será idêntico até à obtenção de um padrão de controlo, momento a partir do qual será administrada por via intravenosa em bólus (durante 20 segundos) o fármaco em estudo e considerado um período de cerca de 20 minutos até ao início da ação desse agente.

1.3. Ensaio de bioluminescência luciferina-luciferase

Durante a realização das cistometrias *in vivo*, as amostras de urina serão colhidas diretamente a partir da uretra para um tubo Eppendorf esterilizado, antes e após a perfusão da bexiga com diferentes fármacos, em tempos previamente determinados. A quantificação de ATP será realizada por bioluminescência, através da reação luciferina-luciferase (Enliten ATP kit, Promega, USA) em luminómetro TD-20/20n (Turner BioSystems Inc., USA).

1.4. Registos miográficos em bexiga de ratazana

Após eutanásia do animal, a bexiga será isolada, a partir dos ureteres e da uretra. A preparação será montada, ao longo de um eixo longitudinal, num banho de órgãos, ligado a um transdutor de força isométrico. Os tecidos serão montados com uma tensão basal de 1 grama e as alterações de tensão serão continuamente registadas através de um registador Hugo-Sachs (Alemanha). A bexiga será cateterizada com uma cânula de três vias e, através de uma seringa infusora automática, serão continuamente instiladas soluções no interior da bexiga, a uma taxa de 2,4 mL/h. A preparação será deixada em equilíbrio, durante 60 minutos, sobre perfusão contínua com solução Tyrode oxigenada (95% O₂ e 5% CO₂) a 37°C. Após este período de equilíbrio, serão continuamente instilados agonistas/antagonistas de recetores purinérgicos no interior da bexiga. Serão

também realizadas experiências com aplicação direta de soluções ao banho de órgãos. O registo miográfico traduzirá as contrações espontâneas do detrusor.

1.5. Imunofluorescência em microscopia confocal

Após eutanásia do animal, será preparada uma amostra de bexiga. Os fragmentos da bexiga serão cuidadosamente esticados (com o urotélio para cima), fixados em paraformaldeído (4%), seguido de sacarose (30%) e rapidamente congelados por imersão em isopentano/gelo seco (-70°C por 2 minutos). Secções de tecido serão obtidas por crio secção (10 µM) e de seguida montadas em meio de poli-L-lisina. Para visualizar a expressão dos recetores será usado um método de imunofluorescência indireto. As secções serão incubadas durante a noite com anticorpos primários (3 µg/ml com 10% de soro normal bovino em PBS contendo 0,05% mertiolato e 0,2% Triton X-100). Posteriormente serão usados anticorpos purificados altamente específicos para vários purinoreceptores (exemplo P2Y₁, P2Y₆, P2X₃). As preparações serão seguidamente lavadas e incubadas durante 3 horas com os anticorpos secundários apropriados. Para demonstrar a co localização dos recetores purinérgicos com estruturas nervosas será usado o anticorpo monoclonal PGP 9.5 (Research Diagnostics, Flanders, NJ). Por último, as secções serão montadas em meio Vectashield (com DAPI) e visualizadas através de microscópio confocal laser (Olympus FV1000, Japan).

2. Análise estatística

Os resultados serão apresentados como média da percentagem de variação face ao controlo \pm erro padrão da média (SEM), correspondendo a um número n de animais / experiências. Para a análise estatística foi usado o teste t de Student para amostras emparelhadas e não emparelhadas ou a análise de variância ANOVA seguida do teste t de Dunnett. *P < 0.05 representa diferenças significativas.

3. Fármacos, soluções e equipamentos usados

As soluções de soro fisiológico (NaCl 0,9% em água destilada e desionizada) serão preparadas em volumes (1L) e armazenadas no frigorífico até serem utilizadas.

As soluções de uretano (2,8 M), em soro fisiológico, serão preparadas diariamente.

As soluções dos fármacos (Tabela IV) serão feitas em soro fisiológico (administração intravesical ou endovenosa) ou em UDP (100 µM) ou PSB0474 (100

nM) (administração intravesical), de acordo com o protocolo utilizado. A Tabela V apresenta os equipamentos a ser usados na realização deste estudo.

Finalidade	Designação	Fabricante	Referência	Fornecedor
Estudos farmacológicos	10-Panx	Tocris	3348	Tocris
	A317491	Sigma	A2979	Sigma
	Ácido flufenâmico	Sigma	F9005	Sigma
	Carbenoxolona	Sigma	C4790	Sigma
	H1152	Tocris	2414	Tocris
	MRS2179	ABCAM	AB 20414	ABCAM
	MRS2578	Tocris	2146	Tocris
	NaCl	Merck		Merck
	PPADS	ASCENT	ASC-009	ASCENT
	PSB0474	Tocris	2715	Tocris
	UDP	Sigma	U 4125	Sigma
	Uretano	Sigma		Sigma
	Enliten ATP kit	Roche	11699709001	Roche

Tabela IV: Fármacos/ sais usados durante as experiências.

Tipo de equipamento	Marca	Modelo	Local
PowerLab	AD Instruments	Chart 5, v.4.2 software	ICBAS/UP, DIFF, LFN
Seringa infusora automática	World Precision Instruments – Aladdin		ICBAS/UP, DIFF, LFN
Luminómetro	Turner BioSystems Inc., USA	TD-20/20n	ICBAS/UP, DIFF, LFN
Registador de força isométrico	Hugo-Sachs		ICBAS/UP, DIFF, LFN
Microscópio confocal	Olympus	FV1000	ICBAS/UP, DIFF, LFN

Tabela V: Equipamentos utilizados na realização deste estudo. Abreviaturas: ICBAS/UP, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto; DIFF, Departamento de Imuno-Fisiologia e Farmacologia; LFN, Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia.

IX. Calendarização

1. Duração

Global: 22 meses

Planeamento: 11 meses

Execução: 11 meses

2. Datas de início e conclusão

Global: Setembro de 2012 a Julho de 2014

Planeamento: Setembro de 2012 a Julho de 2013

Execução: Setembro de 2013 a Julho de 2014

3. Metas a atingir no âmbito do projeto

03/12/2012: Conclusão da redação da introdução e objetivos da proposta do projeto.

28/02/2013: Conclusão da redação do plano científico da proposta do projeto.

31/03/2013: Conclusão da redação do plano científico, plano ético e plano financeiro da proposta do projeto.

30/04/2013: Conclusão da proposta do projeto final.

31/05/2013: Conclusão da proposta da apresentação do projeto.

4. Entregas a efetuar no âmbito do projeto

03/12/2012: Envio da proposta do projeto por e-mail à regente da DIIC – Introdução e Objetivos.

28/02/2013: Envio da proposta do projeto por e-mail à regente da DIIC – Plano científico.

31/03/2013: Envio da proposta do projeto por e-mail à regente da DIIC – Plano científico, Plano ético e Plano financeiro.

30/04/2013: Envio da proposta do projeto por e-mail à regente da DIIC para correção final.

31/05/2013: Envio da proposta do apresentação do projeto por e-mail à regente da DIIC para correção final.

X. Indicadores de produção

1. Comunicações orais e painel

Apresentação oral da proposta nas JIIC (Junho de 2013).

Apresentação oral dos resultados nas JIIC (Junho de 2014).

Outras possibilidades, a combinar com os orientadores:

Apresentação oral da proposta em reunião de Serviço (Maio / Junho de 2013).

Apresentação oral dos resultados em reunião de Serviço (Maio / Junho de 2014).

Apresentação dos resultados em painel, em reunião científica (2014).

2. Trabalhos escritos

Proposta do projeto de investigação (Maio de 2013).

Dissertação de MIM (Julho de 2014).

Artigo para publicação em revista médica nacional ou internacional com arbitragem científica (2014).

Questões éticas

O projeto que me propus levar a cabo encontra-se inserido no projeto intitulado “Papel das purinas no controlo mecanosensitivo do detrusor humano como alvo para o tratamento da bexiga hiperativa” o qual foi autorizado pela DGV, segundo ofício 0420/000/000 de 03/09/2010 (018833), assinado pela Diretora Geral da DGV à data, Dra. Susana Guedes Pombo.

Este projeto tem igualmente o parecer favorável da Comissão de Ética do ICBAS-UP, emitido em Junho de 2013.

Plano financeiro

I. Orçamento

	Custo estimado (€)
Reagentes e material consumível de laboratório (*)	6067,28
Material administrativo (fotocópias, folhas, etc.)	50,00
Impressão de painel para apresentação de resultados	50,00
Inscrição aluna em congresso médico	200,00
Organização das Jornadas de Iniciação à Investigação Clínica	50,00
TOTAL	€6417,28

Tabela VI: Orçamento

(*) O orçamento detalhado é apresentado na página seguinte.

II. Financiamento

O estudo será financiado pelo ICBAS/UP, através de uma bolsa atribuída à DIIC, no valor máximo de 1500,00 euros. O restante financiamento está a cargo do orçamento interno do Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS.

III. Orçamento dos reagentes e material consumível

Finalidade	Designação	Fabricante / Fornecedor	Referência	Preço unitário (€)	Nº unidades	Preço (€) Sem IVA	Subtotal (€)
Estudos farmacológicos	10-Panx	Tocris	3348	115,00	1	115,00	115,00
	A317491	Sigma	A2979	144,00	1	144,00	259,00
	Ácido flufenâmico	Sigma	F9005	32,90	1	32,90	291,90
	Apyrase	Sigma	A6410	138,00	1	138,00	429,90
	ARL67156	Tocris	1283	215,00	1	215,00	644,90
	Capsaicina	Sigma	M2028	72,80	1	72,80	717,70
	Capsazepina	Sigma	C191	92,10	1	92,10	809,80
	Carbenoxol ona	Sigma	C4790	52,00	1	52,00	861,80
	H1152	Tocris	2414	195,00	1	195,00	1056,80
	MRS2179	ABCAM	AB 20414	165,00	1	165,00	1221,80
	MRS2365	Tocris	2157	315,00	1	315,00	1536,80
	MRS2578	Tocris	2146	115,00	1	115,00	1651,80
	NF023	Sigma	N-8652	132,00	1	132,00	1783,80
	POM-1	Tocris	2689	105,00	1	105,00	1888,80
	PPADS	ASCENT	ASC-009	45,00	1	45,00	1933,80
	PSB0474	Tocris	2715	275,00	1	275,00	2208,80
	PSB06126	Tocris	2574	160,00	1	160,00	2368,80
	UDP	Sigma	U 4125	55,80	1	55,80	2424,60
	UTP	Sigma	U 6625	30,40	1	30,40	2455,00
	Enliten ATP kit	Roche	11699709001		1	487,00	2942,00
Procedimento cirúrgico	Ratazanas	Charles River	Não aplicável	15,04	100	15,04	4446,00
	Cânula intravenosa de permanência prolongada	Introcán	425407 4B	29,50	1	29,50	4475,50
	Seringa hipodérmica	Injekt	2622003	5,35	1	5,35	4480,85
	Compressas em não tecido	Bastos Viegas, s.a.	439-004	1,45	10	1,45	4495,35
	Luvas de exame em vinil sem pó	Rubbergold	2506	4,24	10	4,24	4573,75
	Resguardos	Hartmann Molinea	161600	45,00	1	45,00	4582,75
TOTAL sem IVA							4582,75
TOTAL com IVA (23%)							6067,28

Tabela VII: Orçamento dos reagentes e material consumível.

Glossário

Abreviaturas

ACh: Acetilcolina

ADP: Adenosina 5'-difosfato

AMP: Adenosina 5'-monofosfato

ATP: Adenosina 5'-trifosfato

DHL: Desidrogenase láctica

E-NPP: Ectonucleótido pirofosfatase/fosdodiasterase

E-NTPDase: Ectonucleotidases trifosfato difosfohidrolase

GABA: Ácido γ -aminobutírico

IP5I: diinosina pentafosfato

NA: Noradrenalina

NANC: Transmissão não colinérgica e não adrenérgica

NGF: Fator de crescimento nervoso (*neuronal growth factor*)

NO: Monóxido de azoto

PLC: Fosfolipase C

SBG: Síndrome da Bexiga Hiperativa

UDP: Uridina difosfato

UTP: Uridina trifosfato

PARTE II: RELATÓRIO DE EXECUÇÃO

Resultados e Discussão

I. Artigos publicados

- A. Carneiro *et al* (2014). **Activation of P2Y₆ receptors increases the voiding frequency in anaesthetized rats by releasing ATP from the bladder urothelium.** *Br J Pharmacol.* doi: 10.1111/bph.12711. [Epub ahead of print] [IF: 5.067] (Anexo 1).
- B. Timóteo *et al.* (2014). **ATP released via pannexin-1 hemichannels mediates bladder overactivity triggered by urothelial P2Y₆ receptors.** *Biochem Pharmacol.* 87(2):371-9. doi: 10.1016/j.bcp.2013.11.007 [IF: 4.576] (Anexo 2).

II. Contribuição da autora para os artigos publicados

- A. Carneiro *et al* (2014). **Activation of P2Y₆ receptors increases the voiding frequency in anaesthetized rats by releasing ATP from the bladder urothelium.** *Br J Pharmacol.* doi: 10.1111/bph.12711. [Epub ahead of print] [IF: 5.067]

Neste artigo, do qual sou primeira autora, contribui no planeamento, execução e discussão dos resultados das experiências de cistometria *in vivo* e nos registos miográficos *in vitro*. Também participei nas experiências de medição dos níveis urinários de ATP, tendo contribuído no planeamento das experiências, na colheita das amostras de urina e na discussão dos resultados obtidos. Participei igualmente no planeamento das experiências de imunofluorescência, bem como na discussão dos resultados.

- B. Timóteo *et al.* (2014). **ATP released via pannexin-1 hemichannels mediates bladder overactivity triggered by urothelial P2Y₆ receptors.** *Biochem Pharmacol.* 87(2):371-9. doi: 10.1016/j.bcp.2013.11.007 [IF: 4.576]

Neste artigo, onde surjo como segunda autora, contribui no planeamento, execução e discussão dos resultados das experiências de cistometria *in vivo*. Nas experiências de medição dos níveis urinários de ATP dei o meu contributo no planeamento das experiências, na colheita das amostras de urina e na discussão dos resultados obtidos. Nas experiências de imunofluorescência, participei no planeamento, bem como na discussão dos resultados.

III. Resumo circunstanciado do contributo da autora para os trabalhos publicados

A ativação dos recetores P2Y₆ causa um aumento da frequência de esvaziamento da bexiga na ratazana anestesiada

Com o intuito de clarificar o significado fisiológico da sinalização mediada pelos recetores P2Y₆ no controlo da atividade da bexiga testou-se o efeito do nucleótido uracilo, UDP (100 µM), um ligando natural deste subtipo de recetores, e o efeito do PSB0474 (100 nM), um agonista seletivo dos recetores P2Y₆, sobre o padrão urodinâmico observado durante cistometrias na ratazana anestesiada. A infusão de UDP (100 µM) e do PSB0474 (100 nM) no lúmen da bexiga reduziu significativamente ($p < 0,05$) o intervalo entre contrações (ICI) sem afetar a amplitude (A) e a duração (Δt) das contrações vesicais esvaziantes (Ver Figura 1 do artigo no Anexo 1).

O antagonista seletivo não-competitivo dos recetores P2Y₆, MRS2578 (50 nM), preveniu o aumento da frequência miccional devido ao UDP (100 µM) e ao PSB0474 (100 nM) (Ver Figura 1 do artigo no Anexo 1). Quando infundido isoladamente no interior da bexiga, o MRS2578 (50 nM, $n=6$) não alterou significativamente nenhum dos parâmetros urodinâmicos avaliados (ICI, PTh, A e Δt). No entanto, aumentando as concentrações do antagonista P2Y₆ para 100 e 300 nM observou-se um aumento proporcional do ICI e do PTh necessário para iniciar o reflexo miccional sem, contudo, afetar os componentes motores do reflexo (A e Δt) (Ver Figura 2 do artigo no Anexo 1).

Apesar da expressão dos recetores P2Y₂ e P2Y₄, sensíveis ao UTP, já ter sido descrita nas células uroteliais de ratazana em cultura, em estudos de PCR em tempo real, Western blotting e Imunohistoquímica [38], a ativação destes recetores parece ter pouca importância na bexiga intacta. Tal afirmação parece válida uma vez que, a hiperatividade vesical induzida pelo PSB0474 e pelo UDP foi totalmente bloqueada pelo antagonista seletivo não-competitivo dos recetores P2Y₆, o qual é desprovido de efeito sobre a atividade dos recetores P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ e P2Y₁₁ a concentrações inferiores a 10 µM [39]. Estes resultados sugerem ainda que o componente aferente do reflexo miccional na ratazana anestesiada está sob o controlo tónico de recetores P2Y₆ sensíveis ao UDP, já que os parâmetros urodinâmicos afetados, ICI e PTh, estão normalmente associados à fase de preenchimento da bexiga.

Participação dos recetores P2X3 (excitatório) e P2Y₁ (inibitório) no aumento da frequência miccional induzida pelo UDP

O efeito do UDP e do seu análogo estável, PSB0474, assemelha-se ao aumento da frequência miccional observado com a aplicação intraluminal de ATP na bexiga de animais anestesiados, sendo conhecido o envolvimento dos recetores P2X3 localizados nos nervos aferentes suburoteliais neste processo [40]. Foi recentemente demonstrado em trabalhos do Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS que o efeito do ATP, no reflexo miccional, pode ser em parte contrabalançado pelo seu catabolismo em ADP por ectonucleotidases na bexiga humana. O ADP, resultante do metabolismo do ATP, por sua vez pode ativar recetores inibitórios P2Y₁ localizados preferencialmente nos terminais nervosos colinérgicos [41]. Neste contexto, investigou-se a contribuição dos recetores P2X3 e P2Y₁ no aumento da atividade da bexiga causada pelo UDP (100 µM).

A infusão intravenosa do antagonista seletivo para os recetores P2X3, A317491 (100 nM), preveniu completamente o aumento da frequência miccional causada pelo UDP (100 µM). Este antagonista foi desprovido de efeito tanto na A como no Δt das contrações, quando administrado conjuntamente com o UDP (100 µM). Na concentração utilizada, a aplicação intravenosa de A317491 (100 nM) não alterou nenhum dos parâmetros urodinâmicos avaliados durante a distensão vesical com soro fisiológico na ratazana anestesiada (Ver Figura 3 do artigo no Anexo 1). Uma vez que o UDP não é um ligando dos purinorecetores ionotrópicos P2X, estes resultados indicam que o aumento da frequência miccional despoletada pela ativação dos recetores P2Y₆ ocorre indiretamente por via da estimulação dos recetores P2X3, nas fibras nervosas suburoteliais, pelo ATP libertado pelas células uroteliais.

Na presença do antagonista seletivo dos recetores P2Y₁, MRS2179 (300 nM, aplicado por infusão intravenosa contínua), o UDP (100 µM) aumentou em vez de diminuir o ICI. Nestas condições, a redução da frequência miccional pode dever-se, pelo menos em parte, ao aumento do Δt de cada contração esvaziante (Ver Figura 3 do artigo no Anexo 1). Estes resultados sugerem que o efeito excitatório do UDP na bexiga de ratazana é em parte contrabalançado pela ativação dos recetores P2Y₁ inibitórios, corroborando os resultados já obtidos nos estudos em bexigas humanas [41].

O aumento da frequência miccional causado pelo UDP necessita da manutenção do circuito nervoso

Para avaliar a contribuição do sistema nervoso extrínseco para o efeito excitatório vesical induzido pela ativação dos recetores P2Y₆ pelo UDP foi registada a atividade miográfica *in vitro* da bexiga isolada de ratazana (ver o esquema da Figura 6A no Anexo 1).

Os ensaios miográficos realizados em bexiga isolada *in vitro* mostraram que o UDP aumentou ligeiramente a frequência e a amplitude das contrações espontâneas do detrusor, quando adicionado em concentrações elevadas (e.g. 300 µM) ao banho de órgãos em contato direto com a parede da bexiga, mas não quando o mesmo fármaco foi infundido no lúmen vesical através de um cateter (Ver Figura 6 do artigo no Anexo 1). Apesar disto, o efeito do UDP (300 µM) foi mínimo (menos de 10%), quando comparado com o efeito da oxotremorina (30 µM) e α,β -metileno ATP (30 µM), os quais ativam os recetores muscarínicos e P2X₁, respetivamente (resultados não mostrados).

Estes resultados permitem concluir que a maior parte do efeito da ativação dos recetores P2Y₆ depende da integridade do circuito nervoso, ocorrendo por um mecanismo indireto. Não pode ser contudo ignorado um possível contributo menor do aumento do tônus muscular da bexiga resultante da atividade sinérgica dos recetores P2Y₆ e P2X₁, tal como foi descrito em trabalhos anteriores [42].

O agonista P2Y₆, PSB0474, aumenta os níveis urinários de ATP

A infusão intravesical do agonista seletivo dos recetores P2Y₆, PSB0474 (100 nM), aumentou mais de 3 vezes os níveis de ATP medidos no fluido recolhido durante a realização das cistometrias na ratazana anestesiada, sem alterar significativamente a atividade da enzima intracelular, desidrogenase do lactato (DHL), nas mesmas amostras. A atividade da DHL nas amostras de urina colhidas em situação controlo e após infusão com PSB0474 (100 nM) foi de $7,3 \pm 1,4$ mU/mL (n=5) e de $8,0 \pm 3,7$ mU/mL (n=5), respetivamente (Ver Figura 2 do artigo no Anexo 2). Os valores da atividade da DHL e do ATP obtidos nestas condições foram muito inferiores aos detetados após a lesão das células uroteliais através da infusão de uma solução de ácido acético (2% v/v) durante 15 minutos; nestas circunstâncias, os valores obtidos foram de $115,0 \pm 25,5$ nM (n=3) para o ATP e de $21,0 \pm 0,9$ mU/mL (n=3) para a atividade da DHL

urinária. O antagonismo dos recetores P2Y₆ pelo MRS2578 (50 nM) bloqueou o aumento dos níveis urinários de ATP produzido pelo PSB0474 (100 nM), sem afetar a atividade da DHL ($6,3 \pm 0,9$ mU/mL) (Ver Figura 2 do artigo no Anexo 2). Em suma, os dados sugerem que o efeito excitatório indireto dos recetores P2Y₆ depende da libertação de ATP a partir de células uroteliais intactas.

Papel dos hemicanais contendo conexinas e panexinas na libertação de ATP decorrente da ativação de recetores P2Y₆

Os resultados descritos anteriormente sugerem que a ativação dos recetores P2Y₆ aumenta a frequência miccional por um mecanismo envolvendo, pelo menos em parte, a libertação de ATP pelas células uroteliais intactas. Neste trabalho, decidimos clarificar o mecanismo de libertação de ATP pelas células uroteliais testando o possível envolvimento da maquinaria exocitótica e de hemicanais contendo conexinas e panexinas usando inibidores desses mecanismos nos ensaios de cistometria em ratas anesthesiadas.

A libertação de ATP pelas células uroteliais induzida pelo estiramento vesical pode ocorrer por mecanismos de tráfego celular relacionados com a exocitose de vesículas intracelulares a partir da membrana apical das células uroteliais mais superficiais (“*umbrella cells*”) [43, 44]. Para avaliar o envolvimento desta via foram realizadas experiências com dois inibidores da exocitose, Exo-1 (100 µM) e brefeldina A (20 µM). Nas condições experimentais deste trabalho, a infusão intravesical de Exo-1 (100 µM, n=5) não alterou significativamente ($p>0.05$) o padrão urodinâmico observado na situação controlo. O fármaco Exo-1 induz um colapso rápido do aparelho de Golgi impedindo dessa forma o tráfego vesicular e, conseqüentemente, a exocitose. De forma análoga, a infusão intravesical de brefeldina A (20 µM, n=3), outro disruptor do tráfego membranar e da exocitose, foi igualmente desprovida de efeito causando uma diminuição do ICI e do Δt de $5 \pm 3\%$ e $9 \pm 10\%$, respetivamente.

Outro mecanismo possível de tráfego de substâncias a partir das células envolve hemicanais constituídos por subunidades de panexina e conexina. Para investigar esta via usou-se o péptido semelhante ao inibidor da panexina-1, ¹⁰Panx (30 µM), o inibidor preferencial da panexina-1, a carbenoxelona (CBX, 10 µM), o inibidor não seletivo de conexinas, o ácido flufenâmico (FFA, 100 µM), bem como um composto que altera a permeabilidade dos hemicanais ao inibir a Rho cinase, o H1152 (10 nM).

O $^{10}\text{Panx}$ (30 μM) e a CBX (10 μM) foram mais eficazes do que o FFA (100 μM) a reduzir a frequência miccional causada pela distensão vesical na ratazana anestesiada. Estes fármacos afetaram a frequência miccional apenas quando foram aplicados por via intravesical, mas não quando foram administrados por via intravenosa em concentrações mais elevadas (e.g. CBX 20 μM). Nenhum dos inibidores dos hemicanais afetou significativamente a A e o Δt das contrações vesicais (Ver Figura 3 do artigo no Anexo 2). Nestas experiências, o H1152 foi utilizado na concentração de 10 nM de forma a garantir seletividade para a inibição da Rho cinase ($\text{IC}_{50} \sim 0.012 \mu\text{M}$). A aplicação intravesical de H1152 (10 nM) reduziu o ICI das contrações vesicais em $27 \pm 3\%$ (n=4), sem afetar significativamente a A e o Δt .

A aplicação intravesical conjunta de $^{10}\text{Panx}$ (30 μM) ou de CBX (0.1 μM) com PSB 0474 (100 nM) preveniu o aumento da frequência miccional do agonista dos recetores P2Y_6 (Ver Figura 4 do artigo no Anexo 2). O contacto direto dos inibidores dos hemicanais com o urotélio parece ser um pré-requisito para contrariar o efeito excitatório do PSB0474 (100 nM), uma vez que a infusão intravenosa de uma dose cerca de 200 vezes superior (20 μM) de CBX não afetou o efeito excitatório induzido pelo PSB 0474 (100 nM). O urotélio parece estar no centro da ação mediada pelos recetores P2Y_6 no controle do reflexo miccional da ratazana. A inibição da exocitose com Exo-1 (100 μM , n=3), por via intravesical, não alterou o efeito excitatório do PSB 0474 (100 nM) sobre a frequência miccional (Ver Figura 4 do artigo no Anexo 2).

Estes resultados são pioneiros na demonstração de libertação de ATP, pelas células uroteliais, por via de hemicanais contendo panexina-1 (e também conexina 43), em resposta à distensão fisiológica da bexiga. Estudos num modelo de esclerose múltipla em rato revelaram que os animais com depleção do gene codificador da panexina-1 apresentavam uma significativa diminuição da disfunção vesical associada a esta doença [45]. O bloqueio parcial da libertação de ATP pelo ácido flufenâmico foi também relatado no urotélio de coelho [46]. Por outro lado, nestas condições fisiológicas, o envolvimento do mecanismo de exocitose vesicular pode ser praticamente excluído, em consonância com estudos prévios que demonstram que a libertação de ATP pelas células uroteliais não ocorre através de vias de exocitose, dado aumentar na ausência de cálcio e não ser abolida pela TTX [47].

Imunolocalização dos recetores P2Y₆, P2Y₁ e P2X₃ e dos hemicanais contendo panexina-1 e conexina-43 no urotélio e na camada suburotelial na bexiga de ratazana

Os ensaios de imunofluorescência aplicada à microscopia confocal mostraram que os recetores P2Y₆ são abundantemente expressos no urotélio, existindo também alguma marcação em células positivas para a proteína filamentar vimentina localizadas na camada suburotelial (possivelmente miofibroblastos [48]). De destacar o facto dos recetores P2Y₆ se encontrarem expressos em todas as camadas do urotélio, desde a camada basal até às células diferenciadas da superfície (*“umbrella cells”*), marcadas com a citoqueratina 20 (Ver Figura 4 do artigo no Anexo 1).

Tal como já descrito em bexigas de ratazana e de humano [49], tanto os recetores P2X₃ como os recetores P2Y₁ encontram-se expressos no urotélio, sugerindo que estes recetores têm um papel adicional na regulação do componente sensorial da função uroepitelial, que permanece ainda por explorar. Para além disso, os recetores P2X₃, mas não os recetores P2Y₁, co-localizam com o neurofilamento 160, nas pequenas fibras nervosas sub-uroteliais. Este facto confirma o papel mecanosensorial dos recetores P2X₃ na sinalização purinérgica, contribuindo para o início do reflexo miccional (Ver Figura 5 do artigo no Anexo 1).

Este estudo demonstra ainda que existe imunoreatividade à panexina-1 na camada urotelial da bexiga de ratazana, desde a membrana basal até à superfície das células uroteliais diferenciadas. Este padrão de expressão coincide com a imunoreatividade obtida para os recetores P2Y₆ (Ver Figura 6 do artigo no Anexo 2). Ao contrário dos hemicanais de panexina-1, a imunoreatividade para a conexina-43 foi mais abundante na camada basal urotelial e presumivelmente nos miofibroblastos na camada suburotelial (Ver Figura 6 do artigo no Anexo 2).

Para além das evidências histológicas e dos estudos urodinâmicos, o envolvimento dos hemicanais foi ainda confirmado por microscopia de fluorescência em tempo real. Nestas experiências mostrou-se que a ativação dos recetores P2Y₆ pelo PSB0474 aumentou a captação de iodeto de propídeo, um efeito que foi significativamente atenuado pelo CBX, inibidor preferencial da panexina-1. Isto sugere a formação de poros de grandes dimensões na membrana plasmática das células associados à panexina-1 que facilitam a translocação de moléculas de elevado peso molecular (como o iodeto de propídeo) e/ou carregadas eletricamente (como ATP e outros nucleótidos) entre os meios intra e extra celular.

Conclusão

Os dados apresentados fornecem fortes evidências de que a ativação dos recetores P2Y₆ induz hiperatividade vesical na ratazana anestesiada, através da libertação de ATP a partir do urotélio por intermédio de hemicanais contendo panexina-1, levando à ativação subsequente de recetores P2X₃ localizados nos nervos sensitivos suburoteliais. Nestas circunstâncias, a excitabilidade vesical pode ser em parte contrabalançada pela hidrólise do ATP em ADP pelas ectonucleotidases, o qual ativa recetores P2Y₁ inibitórios diminuindo a libertação de ACh pelos neurónios eferentes ativados. Apesar da origem dos nucleótidos de uracilo na bexiga permanecer ainda por esclarecer, este trabalho mostra pela primeira vez uma expressão muito significativa dos recetores P2Y₆ sensíveis ao UDP na camada urotelial e demonstra que a sua ativação pode ter consequências no controlo do reflexo miccional.

Nesta fase, desconhece-se ainda a contribuição dos recetores P2Y₆ para a hiperatividade vesical e nas síndromes vesicais dolorosas em Humanos, apesar das alterações na densidade de células na camada urotelial e suburotelial, na libertação de ATP e nos sinais mediados por purinorecetores terem sido amplamente observados nestas patologias. Neste contexto, um artigo recente publicado pelo Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS demonstrou que o nível urinário de ATP poderá ser um biomarcador dinâmico em mulheres com hiperatividade da bexiga, tendo um significado tanto de diagnóstico como prognóstico [50]. Outros trabalhos em curso parecem apontar para um papel dual da ativação dos recetores P2Y₆ na bexiga humana, indiretamente através da libertação de ATP pelo urotélio (artigo em preparação). Estudos adicionais serão necessários para clarificar com mais detalhe as implicações fisiopatológicas da ativação dos recetores P2Y₆ nos doentes com síndrome da bexiga hiperativa, uma vez que a manipulação farmacológica destas vias poderá ter grande interesse nesta patologia.

A Figura 7 mostra um modelo preliminar das potenciais vias mecanosensitivas de natureza purinérgica, sugeridas pelos resultados deste estudo.

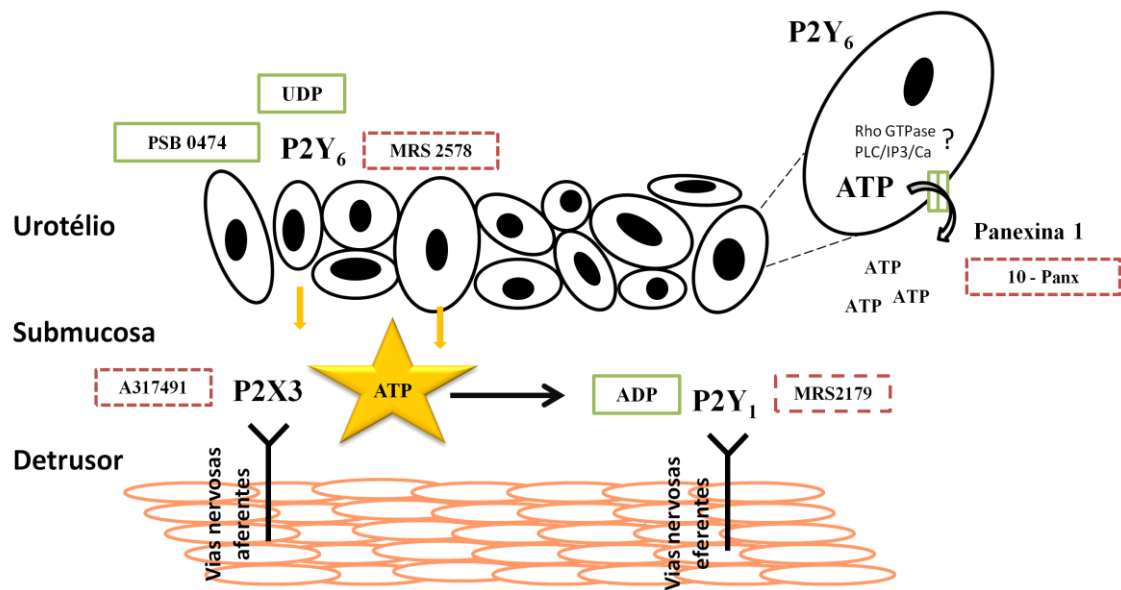


Figura 7. A ativação dos recetores P2Y₆ uroteliais aumenta a frequência miccional na ratazana anestesiada, através da libertação de ATP por intermédio de hemicanais contendo panexina-1. A hiperexcitabilidade induzida pela ativação destes recetores é mediada pela estimulação dos recetores P2X3 suburoteliais e contrabalançada pela ativação dos recetores inibitórios P2Y₁ localizados nos terminais colinérgicos eferentes. Os fármacos nas caixas com linha a tracejado representam os antagonistas, enquanto os fármacos nas caixas com linha contínua correspondem aos agonistas usados neste trabalho.

Referências Bibliográficas

1. Wein, A.J., *Diagnosis and treatment of the overactive bladder*. Urology, 2003. 62(5 Suppl 2): p. 20-7.
2. Yoshimura, N., *Physiology and Pharmacology of the Bladder and Urethra*, in *Urology* 2012, Elsevier Saunders.
3. Burnstock, G., *Purinergic signaling on urinary tract*. [book auth.] in *Handbook of Experimental Pharmacology, Purinergic and Pyrimidinergic Signalling I-Molecular, Nervous and Urogenitary System Function*. 2001, Springer- Verlag: Berlim
4. Langley, J.N. and H.K. Anderson, *The Innervation of the Pelvic and adjoining Viscera: Part II. The Bladder. Part III. The External Generative Organs. Part IV. The Internal Generative Organs. Part V. Position of the Nerve Cells on the Course of the Efferent Nerve Fibres*. J Physiol, 1895. 19(1-2): p. 71-139.
5. Burnstock, G., *Purinergic nerves*. Pharmacol Rev, 1972. 24(3): p. 509-81.
6. Ralevic, V. and G. Burnstock, *Receptors for purines and pyrimidines*. Pharmacol Rev, 1998. 50(3): p. 413-92.
7. Gevers, J.R., et al., *Pharmacology of P2X channels*. Pflugers Arch, 2006. 452(5): p. 513-37.
8. O'Reilly, B.A., et al., *A quantitative analysis of purinoceptor expression in human fetal and adult bladders*. J Urol, 2001. 165(5): p. 1730-4.
9. Wu, C., et al., *A comparison of the mode of action of ATP and carbachol on isolated human detrusor smooth muscle*. J Urol, 1999. 162(5): p. 1840-7.
10. Gomes-Marinhas, J., *Sinalização Purinérgica num modelo in vivo de Bexiga Hiperactiva no rato*, 2009, Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto.
11. Kullmann, F.A., et al., *Activation of muscarinic receptors in rat bladder sensory pathways alters reflex bladder activity*. J Neurosci, 2008. 28(8): p. 1977-87.
12. Obara, K., H. Lepor, and P.D. Walden, *Localization of P2Y1 purinoceptor transcripts in the rat penis and urinary bladder*. J Urol, 1998. 160(2): p. 587-91.
13. King, B.F., et al., *Investigation of the effects of P2 purinoceptor ligands on the micturition reflex in female urethane-anaesthetized rats*. Br J Pharmacol, 2004. 142(3): p. 519-30.

14. Chen, X., D.C. Molliver, and G.F. Gebhart, *The P2Y2 receptor sensitizes mouse bladder sensory neurons and facilitates purinergic currents*. J Neurosci, 2010. 30(6): p. 2365-72.
15. Birder, L.A., et al., *Alterations in P2X and P2Y purinergic receptor expression in urinary bladder from normal cats and cats with interstitial cystitis*. Am J Physiol Renal Physiol, 2004. 287(5): p. F1084-91.
16. Fry, C.H., *Cell Biology*, in *Incontinence*. 2009. p. 113-137.
17. Bodin, P. and G. Burnstock, *Purinergic signaling: ATP release*. Neurochem Res, 2001. 26: p. 959-969
18. Birder, L.A. and W.C. de Groat, *Mechanisms of disease: involvement of the urothelium in bladder dysfunction*. Nat Clin Pract Urol, 2007. 4(1): p. 46-54.
19. Wein, A.J. and E.S. Rovner, *Definition and epidemiology of overactive bladder*. Urology, 2002. 60(5 Suppl 1): p. 7-12; discussion 12.
20. Stewart, W., *Prevalence and impact of overactive bladder in the US: results from the NOBLE program*, in *The International Continence Society* 2001: Seoul, Korea.
21. Yoshimura, N. and M.B. Chancellor, *Neurophysiology of lower urinary tract function and dysfunction*. Rev Urol, 2003. 5 Suppl 8: p. S3-S10.
22. Hill, W.G. and M.L. Zeidel, *Reconstituting the barrier properties of a water-tight epithelial membrane by design of leaflet-specific liposomes*. J Biol Chem, 2000. 275(39): p. 30176-85.
23. Simons, K. and G. van Meer, *Lipid sorting in epithelial cells*. Biochemistry, 1988. 27(17): p. 6197-202.
24. Sun, T.T., L. F.X., and W. X.R., *Uroplakins as markers of urothelial differentiation* Adv Exp Med Biol, 1999. 462: p. 7-18.
25. Apodaca, G., et al., *Disruption of bladder epithelium barrier function after spinal cord injury*. Am J Physiol Renal Physiol, 2003. 284(5): p. F966-76.
26. Burnstock, G., et al., *Inhibition of the Smooth Muscle on the Taenia Coli*. Nature, 1963. 200: p. 581-2.
27. Burnstock, G., et al., *Innervation of the Guinea-Pig Taenia Coli: Are There Intrinsic Inhibitory Nerves Which Are Distinct from Sympathetic Nerves?* Int J Neuropharmacol, 1964. 3: p. 163-6.

28. Drury, A.N. and A. Szent-Gyorgyi, *The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart*. J Physiol, 1929. 68(3): p. 213-37.
29. Holton, P., *The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves*. J Physiol, 1959. 145(3): p. 494-504.
30. Burnstock, G., *Purinergic signalling: Its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future*. Bioessays, 2012. 34(3): p. 218-25.
31. Burnstock, G., *Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission*. . Physiol Rev, 2007. 87: p. 659-797.
32. Burnstock, G., *A basis for distinguishing two types of purinergic receptor*. In Straub RW, Bolis L, eds; *Cell Membrane receptors for drugs and hormones: A multidisciplinary approach*. Raven Press, New York, 1978: p. 107-18.
33. Inoue, K., *Purinergic systems in microglia*. Cell Mol Life Sci, 2008. 65(19): p. 3074-80.
34. Zimmermann, H., *Nucleotide signalling in nervous system development*. Pflügers Archiv European Journal of Physiology, 2006. 452: p. 573-588.
35. Duarte-Araujo, M., et al., *Relative contribution of ecto-ATPase and ecto-ATPDase pathways to the biphasic effect of ATP on acetylcholine release from myenteric motoneurons*. Br J Pharmacol, 2009. 156(3): p. 519-33.
36. Lewis, C., *Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons*. Nature, 1995. 377 p. 432-435.
37. Cockayne, D.A., et al., *Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X3-deficient mice*. Nature, 2000. 407(6807): p. 1011-5.
38. Chopra B, G.J., Barrick SR, Hanna-Mitchell AT, Beckel JM, Ford AP, et al., *Expression and function of rat urothelial P2Y receptors*. Am J Physiol Renal Physiol 2008. 294:: p. F821-9.
39. Mamedova, L.K., et al., *Diisothiocyanate derivatives as potent, insurmountable antagonists of P2Y6 nucleotide receptors*. Biochem Pharmacol, 2004. 67(9): p. 1763-70.
40. Pandita, R.K. and K.E. Andersson, *Intravesical adenosine triphosphate stimulates the micturition reflex in awake, freely moving rats*. J Urol, 2002. 168(3): p. 1230-4.
41. Silva I, C.J., Ferreirinha F, Magalhães-Cardoso MT, Silva-Ramos M, Sévigny J, Correia-de-Sá P., *Bladder overactivity due to global impairment of ecto-*

- NTPDases in humans with lower urinary tract disorders exhibiting unbalanced ATP/ adenosine formation. Auton. Neurosci. Basic Clinical*, 2011. 163: p. 49-50.
42. Yu, W., et al., *Extracellular UDP enhances P2X-mediated bladder smooth muscle contractility via P2Y(6) activation of the phospholipase C/inositol trisphosphate pathway*. FASEB J, 2013. 27(5): p. 1895-903.
 43. Truschel ST, W.E., Ruiz WG, Leung SM, Rojas R, Lavelle J, et al., *Stretchregulated exocytosis/endocytosis in bladder umbrella cells*. Mol Biol Cell, 2002. 13: p.:830–46.
 44. Yu, W., P. Khandelwal, and G. Apodaca, *Distinct apical and basolateral membrane requirements for stretch-induced membrane traffic at the apical surface of bladder umbrella cells*. Mol Biol Cell, 2009. 20(1): p. 282-95.
 45. Negoro, H., et al., *Pannexin 1 involvement in bladder dysfunction in a multiple sclerosis model*. Sci Rep, 2013. 3: p. 2152.
 46. Wang, E.C., et al., *ATP and purinergic receptor-dependent membrane traffic in bladder umbrella cells*. J Clin Invest, 2005. 115(9): p. 2412-22.
 47. Ferguson, D.R., I. Kennedy, and T.J. Burton, *ATP is released from rabbit urinary bladder epithelial cells by hydrostatic pressure changes--a possible sensory mechanism?* J Physiol, 1997. 505 (Pt 2): p. 503-11.
 48. Fry, C.H., et al., *Modulation of spontaneous activity in the overactive bladder: the role of P2Y agonists*. Am J Physiol Renal Physiol, 2012. 302(11): p. F1447-54.
 49. Elneil, S., et al., *Distribution of P2X(1) and P2X(3) receptors in the rat and human urinary bladder*. Pharmacology, 2001. 63(2): p. 120-8.
 50. Silva-Ramos, M., et al., *Urinary ATP may be a dynamic biomarker of detrusor overactivity in women with overactive bladder syndrome*. PLoS One, 2013. 8(5): p. e64696.

Anexos

Anexo 1



RESEARCH PAPER

Activation of P2Y₆ receptors increases the voiding frequency in anaesthetized rats by releasing ATP from the bladder urothelium

Inês Carneiro^{1*}, M. Alexandrina Timóteo^{1*}, Isabel Silva¹, Cátia Vieira¹, Catarina Baldaia¹, Fátima Ferreirinha¹, Miguel Silva-Ramos^{1,2} and Paulo Correia-de-Sá¹

¹Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia/UMIB, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto (ICBAS-UP), Portugal, and ²Serviço de Urologia, Centro Hospitalar do Porto (CHP), Porto, Portugal

Correspondence

Paulo Correia-de-Sá, Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia – UMIB, Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS) – Universidade do Porto (UP), R. Jorge Viterbo Ferreira, 228, Porto 4050-313, Portugal. E-mail: farmacol@icbas.up.pt

*These authors contributed equally to this work.

Keywords

urinary bladder; urothelium; micturition reflex; P2Y₆ receptor; ATP release; UDP; acetylcholine release; anaesthetized rat

Received

10 August 2013

Revised

13 January 2014

Accepted

2 March 2014

BACKGROUND AND PURPOSE

Despite the abundant expression of the UDP-sensitive P2Y₆ receptor in urothelial cells and sub-urothelial myofibroblasts its role in the control of bladder function is not well understood.

EXPERIMENTAL APPROACH

We compared the effects of UDP and of the selective P2Y₆ receptor agonist, PSB0474, on bladder urodynamics in anaesthetized rats; the voided fluid was tested for ATP bioluminescence. The isolated urinary bladder was used for *in vitro* myographic recordings and [³H]-ACh overflow experiments.

KEY RESULTS

Instillation of UDP or PSB0474 into the bladder increased the voiding frequency (VF) without affecting the amplitude (A) and the duration (Δt) of bladder contractions; an effect blocked by the P2Y₆ receptor antagonist, MRS2578. Effects mediated by urothelial P2Y₆ receptors required extrinsic neuronal circuitry as they were not detected in the isolated bladder. UDP-induced bladder hyperactivity was also prevented by blocking P2X₃ and P2Y₁ receptors, respectively, with A317491 and MRS2179 applied *i.v.* UDP decreased [³H]-ACh release from stimulated bladder strips with urothelium, but not in its absence. Inhibitory effects of UDP were converted into facilitation by the P2Y₁ receptor antagonist, MRS2179. The P2Y₆ receptor agonist increased threefold ATP levels in the voided fluid.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

Activation of P2Y₆ receptors increased the voiding frequency indirectly by releasing ATP from the urothelium and activation of P2X₃ receptors on sub-urothelial nerve afferents. Bladder hyperactivity may be partly reversed following ATP hydrolysis to ADP by E-NTPDases, thereby decreasing ACh release from cholinergic nerves expressing P2Y₁ receptors.

Abbreviations

EFS, electrical field stimulation; E-NTPDases, ecto-nucleotidases; NF160, neurofilament 160; TTX, tetrodotoxin; VACHT, vesicular ACh transporter; Vim, vimentin

Introduction

Purinergic transmission has increasingly been accepted as having an important modulatory role in many aspects of bladder function. There is good evidence that the primary source of ATP in the bladder is the urothelium (Ferguson *et al.*, 1997; Kumar *et al.*, 2004). This nucleotide exerts its effects predominantly through the activation of P2 purinoceptors located in the detrusor smooth muscle (P2X1) and in sub-urothelial pelvic nerve afferents (P2X3) that are involved in the micturition reflex triggered by bladder filling (Burnstock, 1999; Cockayne *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2008; receptor nomenclature follows Alexander *et al.*, 2013a). Thus, intravesical ATP decreases bladder capacity and micturition volume in a concentration-dependent manner, with limited effects on detrusor tension (Pandita and Andersson, 2002). ATP stimulation of micturition may be partly reversed by its catabolism, by ecto-nucleotidases (E-NTPDases) of the urinary bladder, into ADP, which could then act through inhibitory P2Y₁ receptors on cholinergic nerve endings in the human bladder (Silva *et al.*, 2011; nomenclature see Alexander *et al.*, 2013b). Recently, evidence has emerged supporting a role for sub-urothelial myofibroblasts in detrusor contraction, which also express P2X and P2Y purinoceptors (Fry and Rossen, 2007; Fry *et al.*, 2007).

Deregulation of purinergic signalling through the abnormal production and release of ATP or altered expression of various P2 purinoceptors is a common feature of many urological diseases (Ruggieri, 2006; Fry and Rossen, 2007). Substantial amounts of ATP are released from urothelial cells in response to mechanical stretch, inflammatory mediators and chemical irritation (see Ferguson *et al.*, 1997; Vlaszkovska *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2005). Increase in the purinergic tone of the bladder has been associated with interstitial cystitis, detrusor overactivity, outlet obstruction, inflammation, neurogenic bladder, spinal cord lesions and ageing. Our group has provided evidence that urinary ATP may be a dynamic biomarker of detrusor activity in women with overactive bladder syndrome (Silva-Ramos *et al.*, 2013). There is, however, very limited understanding of the molecular mechanisms involved in purinergic signalling changes underlying these pathologies, limiting the efficacy of treatment options.

In contrast to the compelling evidence for the extracellular signalling role of ATP, the hypothesis that uracil nucleotides may also fulfil an autocrine/paracrine role has only recently gained experimental support. Previous studies showed that rat urothelial cells express P2Y₂ (and to a lesser extent P2Y₄) receptors recognizing UTP as the most potent agonist, which upon activation lead to the release of ATP (Chopra *et al.*, 2008). On the other hand, UDP-sensitive P2Y₆ receptors have been involved in the generation of large spontaneous contractions and propagating waves of intracellular Ca²⁺ and membrane depolarization originating in sub-urothelial myofibroblasts and spreading to the detrusor smooth muscle, in rats submitted to spinal cord transection (Fry *et al.*, 2012). Furthermore, Yu *et al.* (2013) using myographic recordings demonstrated that UDP, acting on P2Y₆ receptors, interplays with P2X1 receptors in a synergistic manner to increase bladder smooth muscle tone. Despite the signalling effects of P2Y₆ receptors in sub-urothelial myofi-

broblasts and detrusor smooth muscle fibres, we were intrigued by the observation that P2Y₆ receptors are most abundantly expressed in urothelial cells with discrete labelling in the sub-urothelial layer (see immunostaining in Sui *et al.*, 2006), but no data have been produced to date regarding its role in the urothelium, to control bladder function.

This study was designed to investigate the ability of urinary UDP and its stable analogue PSB0474, which exhibits selectivity for P2Y₆ receptors (El-Tayeb *et al.*, 2006), to modulate bladder urodynamics in the anaesthetized rat *in vivo*. The rat has been widely used as a model to study the purinergic mechanisms underlying bladder function in health and disease (see Burnstock, 2014), which in most instances compared well with that observed in humans. Given our findings, showing that both UDP and PSB0474 increased the voiding frequency in the anaesthetized rat only if the bladder nervous circuitry was left intact, we hypothesized that ATP released from urothelium could be the mediator involved in P2Y₆ receptor-operated bladder hyperactivity. Therefore, we measured the ATP levels in the voiding fluid before and after P2Y₆ receptor activation. The participation of excitatory P2X3 and inhibitory P2Y₁ purinoceptors located, respectively, on sub-urothelial nerve afferents and cholinergic nerve efferents was investigated in the anaesthetized rat *in vivo* and in stimulated bladder strips *in vitro*.

Methods

Animals

Animal care and experimental procedures were in accordance with the guidelines prepared by Committee on Care and Use of Laboratory Animal Resources (National Research Council, USA) and followed the European Communities Council Directive (86/609/EEC). All studies involving animals are reported in accordance with the ARRIVE guidelines for reporting experiments involving animals (Kilkenny *et al.*, 2010; McGrath *et al.*, 2010). A total of N animals were used in the experiments described here. Male rats (Wistar, 300–450 g; Charles River, Barcelona, Spain) were kept at a constant temperature (21°C) and a regular light (06:30–19:30 h)–dark (19:30–06:30 h) cycle, with food and water provided *ad libitum*.

In vivo cystometric recordings

The experiments were carried out in spontaneously breathing rats, anaesthetized with urethane (1.0–1.2 g·kg⁻¹). Core body temperature was kept between 36 and 38°C with the help of a heating pad controlled by a thermosensor connected to a rectal probe. A catheter connected to an injection pump was inserted into the left jugular vein to permit saline infusion (4 mL·h⁻¹·kg⁻¹) and i.v. drugs application. After exposing the urinary bladder through a medial abdominal incision, a three-barrel catheter was inserted through its dome. One barrel was connected to an automated perfusion pump for saline and/or drugs infusion; a second barrel was attached to a pressure transducer for continuous monitoring of intravesical pressure; the third barrel was used either to drain or to close the bladder circuit in order to initiate the micturition reflex. The bladder pressure was continuously monitored on a

computer screen with a PowerLab data acquisition system (Chart 5, version 4.2 software; AD Instruments, USA), which was also used to record haemodynamic and respiratory parameters in the anaesthetized rat.

After surgical preparation, a 60 min equilibration period was undertaken during which saline was infused into the urinary bladder at 0.04 mL·min⁻¹ and allowed to freely drain out of the bladder (open circuit). The micturition reflex was initiated by closing the draining barrel while keeping intravesical infusion of saline at a constant flow rate (0.04 mL·min⁻¹), which is within the range used by other authors to obtain stable micturition cycles during continuous cystometrograms in anaesthetized rats (see Honda *et al.*,

2012). The flow rate was two- to fourfold higher than the normal urinary debit in experimental rats (15–30 mL·d⁻¹) and compared with the conditions used in standard filling cystometry (urodynamic test) in humans. Voiding contractions were assumed as large-amplitude rhythmic bladder contractions accompanied by urine draining through the urethra when bladder pressure reached a certain threshold (see Figure 1A). The intercontraction interval (ICI, min) and the pressure threshold (PTh, cm of H₂O) that is required to initiate the voiding reflex are normally associated with the sensitive component of the micturition reflex (filling phase); conversely, the amplitude (A, cm of H₂O) and the duration (Δt, s) of the voiding contractions are mostly associated with

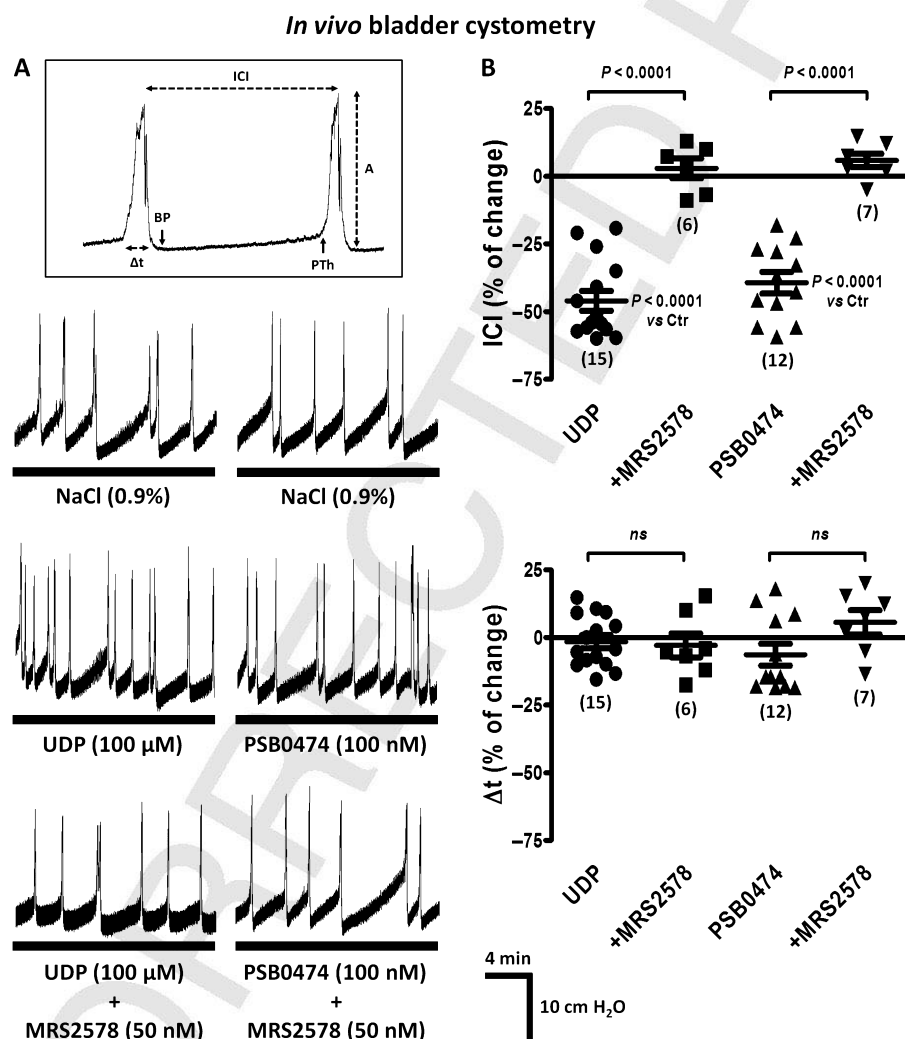


Figure 1

(A) Bladder cystometry recordings during normal saline (0.9%-w/v of NaCl) infusion into the urinary bladder of urethane-anaesthetized rats: comparison of the effects of UDP (100 μM) and PSB0474 (100 nM) in the absence and in the presence of the selective P2Y₆ receptor antagonist, MRS2578 (50 nM). Large-amplitude rhythmic bladder contractions correspond to voiding contractions when they were accompanied by urine draining through the urethra. The inset shows the urodynamic parameters evaluated: ICI (min), PTh (cm of H₂O), amplitude (A, cm of H₂O) and duration (Δt, s) of the voiding contractions. Stable urodynamic responses to UDP and PSB0474 were reached in 10–15 min. Co-application of MRS2578 with the agonists preceded urodynamic measurements by at least 20 min. (B) Scatter plots representing the percentage change of the ICI and of the duration (Δt) of voiding contractions as compared with control values (Ctr, 0%). The vertical bars represent SEM of a *n* number of animals (shown in parenthesis). *P* values as shown; significantly different from control samples (saline infusion) or from the effects of UDP or PSB0474, applied alone; unpaired Student's *t*-test with Welch's correction.

the motor component of the micturition reflex (emptying phase). For the sake of clarity, the results presented in this study will consider, in most instances, the percentage change in of ICI and Δt values, compared with the control situation achieved after six consecutive voiding contractions of similar amplitude. Test drugs were applied either into the bladder lumen (by changing the syringe connected to the automated perfusion pump, $0.04 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) or i.v. through the catheter inserted into the left jugular vein.

In vitro myographic recordings

Myographic recordings were performed *in vitro* in whole-mounts of the rat urinary bladder. After removal of the urinary bladder from the animal, a three-barrel catheter was inserted through its dome as described for the *in vivo* cystometric assays. The preparation was then mounted along its longitudinal axis in a 12 mL capacity perfusion chamber and connected to an isometric force transducer via a thread tied to the proximal urethra. Tension responses were recorded isometrically at a resting tension of 10 mN with a force transducer and displayed on a Hugo-Sachs (Germany) thermosensitive paper recorder. Preparations were allowed to equilibrate for 60 min under continuous superfusion of both the outside and the inside of the bladder with gassed (95% O_2 and 5% CO_2) Tyrode's solution containing (mM): NaCl 137, KCl 2.7, CaCl_2 1.8, MgCl_2 1, NaH_2PO_4 0.4, NaHCO_3 11.9, glucose 11.2, at 37°C . After closing the draining barrel of the catheter inserted into the lumen, bladders were then filled with Tyrode's solution to a maximum of 0.15 mL at increments of 10 μL to simulate the conditions used in the *in vivo* cystometric assays ($0.04 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$). UDP (300 μM) was superfused either through the catheter inserted into the bladder dome or directly into the bathing solution outside the bladder wall. The effect of UDP was compared with that of the muscarinic receptor agonist, oxotremorine (30 μM), and the ATP analogue, α, β -methylene ATP (30 μM).

Measurement of urinary ATP

For measuring urinary ATP content, samples were collected from the draining barrel of the catheter inserted in the bladder during *in vivo* fluid cystometry experiments. Sterile samples were immediately freeze-dried in liquid nitrogen and preserved at -80°C until ATP determination (see Silva-Ramos *et al.*, 2013). Undiluted samples were unfrozen to 25°C and afterwards centrifuged at $3000 \times g$ at room temperature for 20 s. A mixture of luciferine-luciferase was added to the supernatant according to the manufacturer's instructions (ATP Bioluminescence Assay Kit HS II, Roche Applied Science Indianapolis, IN, USA). Luminescence was detected using a microplate reader (Synergy HT, BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA). Sample bioluminescence was compared with external ATP standards prepared daily within the same concentration range. All samples were run in duplicate. Each sample remaining was used to quantify the LDH (EC 1.1.1.27) activity (Keiding *et al.*, 1974). LDH is an intracellular enzyme that is commonly used as an indicator of cell integrity.

$[^3\text{H}]\text{-ACh}$ release experiments

The experiments were performed at 37°C in urinary bladder strips with or without urothelium mounted in 365 μL capac-

ity chambers of a Brandel SF-12 automated superfusion system (Valley International Corp., Austin, TX, USA). Preparations were continuously superfused with gassed (95% O_2 and 5% CO_2) Tyrode's solution. Urinary bladders were cut in half; one half was left intact and the other half had its urothelium gently removed with a cottonwool swab.

After a 30 min equilibration period, the preparations were loaded for 40 min with 1 μM $[^3\text{H}]\text{-choline}$ (specific activity $5 \mu\text{Ci} \cdot \text{nmol}^{-1}$) under electrical stimulation at 1 Hz frequency (EFS, 0.2 ms pulse width). Washout ($1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) of the preparations was performed over 120 min with Tyrode's solution supplemented with the choline uptake inhibitor, hemicholinium-3 (10 μM). Tritium outflow was evaluated by liquid scintillation spectrometry (TriCarb2900TR, Perkin Elmer, Boston, MA, USA) (percentage of counting efficiency: $55 \pm 2\%$) after appropriate background subtraction, using 1 mL bath samples automatically collected every 1 min.

$[^3\text{H}]\text{-ACh}$ release was evoked by two periods of EFS (S_1 and S_2) each consisting of 200 square wave pulses of 0.2 ms duration delivered at 10 Hz frequency. EFS of the rat urinary bladder increased the release of $[^3\text{H}]\text{-ACh}$ in a Ca^{2+} - and tetrodotoxin (TTX)-sensitive manner, and hence, originates from vesicle exocytosis from cholinergic nerves. Test drugs were added 8 min before S_2 and were present up to the end of the experiments. In control conditions, S_2/S_1 ratios were 0.91 ± 0.03 ($n = 5$) and 0.91 ± 0.07 ($n = 4$) when bladder strips were used with and without the urothelium respectively. None of the drugs significantly ($P > 0.05$) changed the basal tritium outflow.

At the end of the experiments, the preparations were fixed in PLP solution (paraformaldehyde 2%, lysine 0.075 M, sodium phosphate 0.037 M, sodium periodate 0.01 M) for 16 h at 4°C and stained with haematoxylin-eosin for histological observation, to confirm the presence or the absence of the urothelium.

Immunofluorescence staining and confocal microscopy observation

Excised bladder fragments were stretched in all directions, pinned onto Petri dishes coated with Sylgard and fixed in PLP solution for 16 h at 4°C . Fixed tissue was cryoprotected with a solution containing 20% anhydrous glycerol dissolved in 0.1 M phosphate buffer, frozen, sectioned (16 μm) and incubated with a blocking buffer solution consisting of FBS 10%, BSA 1%, Triton X-100 0.3% in PBS, for 2 h with constant stirring. After blocking and permeabilization, samples were incubated with selected primary antibodies (see Table 1) diluted in the incubation buffer (FBS 5%, serum albumin 1%, Triton X-100 0.3% in PBS), at 4°C , for 16 h. For double immunostaining, antibodies were combined before application to tissue samples. After washing away unbound primary antibody, the sections were incubated with secondary antibodies (Table 1) in the dark for 2 h, at room temperature. Finally, tissue samples were mounted on optical-quality glass slides using VectaShield with DAPI as mounting media (VectorLabs) and stored in the dark at 4°C . Observations were performed and analysed with a laser-scanning confocal microscope (Olympus FluoView, FV1000, Tokyo, Japan).

To test the specificity of the antibody for P2Y_6 receptors (APR-011), some sections were processed with the primary antibody pre-adsorbed with a control antigen corresponding

Table 1
Primary and secondary antibodies used in immunohistochemistry experiments

Antigen	Code	Host	Dilution	Supplier
Primary antibodies				
P2Y ₁	APR-009	Rabbit	1:75	Alomone
P2Y ₆	APR-011	Rabbit	1:100	Alomone
P2Y ₆	ABIN1386282	Rabbit	1:150	Antibodies Online
P2X ₁	APR-001	Rabbit	1:50	Alomone
P2X ₃	APR-016	Rabbit	1:100	Alomone
NTPDase2	BZ1-5F	Rabbit	1:400	J. Seigny
Cytokeratin 20 (CK20)	M7019	Mouse	1:100	Dako
Vimentin	M0725	Mouse	1:150	Dako
NF160	Ab7794	Mouse	1:600	Abcam
VAcHT	AB1578	Goat	1:750	Chemicon
Secondary antibodies				
Alexa Fluor 488 anti-rb	A-21206	Donkey	1:1500	Mol. Probes
Alexa Fluor 568 anti-ms	A-10037	Donkey	1:1500	Mol. Probes
Alexa Fluor 633 anti-gt	A-21082	Donkey	1:1500	Mol. Probes

to the amino acid sequence 311–328 of the rat P2Y₆ receptor (Q63371, Alomone Labs, Jerusalem, Israel). Pre-adsorption was performed by incubating the P2Y₆ primary antibody overnight at 4°C with 10-fold molar excess of the antigen peptide sequence. Sections were then processed as described earlier with the pre-absorbed antiserum and with the normal antiserum, in parallel. During documentation of P2Y₆ receptor pre-absorption controls, settings on the confocal microscope were adjusted appropriately to show P2Y₆-immunoreactivity for sections that were processed normally (no pre-absorption) and these settings were maintained when documenting pre-absorption controls to minimize bias, during capture and printing of digital images.

In situ E-NTPDase activity experiments

For the histochemical localization of E-NTPDase activity, formation of phosphate anion was evaluated by the Wachstein/Meisel lead phosphate method. Briefly, excised bladder fragments were frozen in a bath of isopentane pre-cooled in liquid N₂, sectioned (8 µm) and preincubated for 45 min at room temperature in 50 mM Tris-maleate-sucrose (TMS) buffer, pH 7.4 containing 2 mM CaCl₂, 0.25 M sucrose and 2.5 mM β-glycerophosphate, an inhibitor of the alkaline phosphatase (AP) activity. Enzymic reactions were performed for 1 h at 37°C in TMS buffer supplemented with 5 mM MnCl₂, 2 mM Pb(NO₃)₂, 3% dextran T250, and in the presence of 30 µM of each substrate (ATP and ADP). The substrate was omitted in control experiments. After the enzymatic reaction, sections were washed with TMS buffer and revealed by incubation with (NH₄)₂S (1%v.v⁻¹) for exactly 1 min. Samples were then mounted using Faramount Aqueous Mounting Medium (Dako), stored at 4°C and observed under a FV1000 microscope running the Cell F software (Olympus, Tokyo, Japan).

Data analysis

Results are expressed as mean ± SEM, with *n* indicating the number of animals used for a particular set of experiments. Only one experimental procedure (e.g. agonist in the absence and in the presence of the antagonist) was performed per rat *in vivo*. Because of limited inter-individual variation, randomly chosen groups of five to seven animals of the same strain, gender and weight (male Wistar rats of 300–450 g) were considered sufficient to replicate each experimental protocol. Statistical analysis of data was carried out using Graph-Pad Prism 5.04 software (La Jolla, CA, USA). Unpaired Student's *t*-test with Welch's correction was used for statistical analysis when parametric data was considered. For multiple comparisons, one-way ANOVA followed by Dunnett's modified *t*-test was used. *P* < 0.05 (two-tailed) values were considered to show significant differences between means.

Materials

A317491 (5-[[[(3-phenoxyphenyl) methyl] [(1S)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthalenyl] amino] carbonyl]-1,2,4-benzenetricarboxylic acid sodium salt hydrate), ADP, ARL67156 (6-N,N-diethyl-D-β,γ-dibromomethylene ATP trisodium salt), ATP, α,β-methylene ATP, MRS2578 (N,N''-1,4-butanediylbis[N'-(3-isothiocyanatophenyl) thio-urea], oxotremorine sesquifumarate, PSB0474 (3-(2-oxo-2-phenylethyl)-uridine-5'-diphosphate disodium salt), TTX citrate were obtained from Tocris Bioscience (Bristol, UK); Choline chloride, FBS, lysine, pyridoxal phosphate-6-azo(benzene-2,4-disulfonic acid) tetrasodium salt hydrate (PPADS), paraformaldehyde, sodium periodate, UDP and urethane were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA); MRS2179 (2'-deoxy-N⁶-methyladenosine 3',5'-bisphosphate tetrasodium salt) was obtained from ABCAM (Cambridge, UK); [methyl-³H]choline chloride (in ethanol,

85.5 Ci·mmol⁻¹) was from Perkin Elmer; serum albumin and Triton X-100 were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). The antibody against E-NTPDase2 was a kind gift from J. Sévigny (Univ. Laval, Québec, QC, Canada). Luciferin-luciferase ATP bioluminescence assay kit HS II was purchased from Roche Applied Science. Stock solutions of MRS2578 and A317491 were prepared in DMSO. Other drugs were prepared in saline (*in vivo* cystometric recordings) or in Tyrode's solution (*in vitro* experiments). All stock solutions were stored as frozen aliquots at -20°C. Dilutions of these stock solutions were made daily and appropriate solvent controls were done. No statistical differences between control experiments, made in the absence or in the presence of the solvents at the maximal concentrations used (0.5% v/v), were observed.

Results

Activation of urothelial P2Y₆ receptors increases the voiding frequency in the anaesthetized rat *in vivo*

Figure 1 shows the effect of UDP (100 µM) and of its synthetic analogue that is highly selective for P2Y₆ receptors, PSB0474 (100 nM) (El-Tayeb *et al.*, 2006), on bladder urodynamics in the anaesthetized rat. Infusion of UDP (100 µM) and PSB0474 (100 nM) into the lumen of the urinary bladder decreased the ICI, to about the same extent, without significantly affecting both the amplitude (A) and the duration (Δt) of voiding bladder contractions. The selective non-competitive P2Y₆ receptor antagonist, MRS2578 (50 nM) (Mamedova *et al.*, 2004), prevented the increases in the voiding frequency caused by UDP (100 µM) and PSB0474 (100 nM) (see Figure 1B). Blockade of the increased bladder activity caused by UDP (100 µM) was also achieved with the non-selective P2 receptor antagonist, PPADS (10 µM, *n* = 3) (data not shown).

When applied alone into the bladder lumen, the P2Y₆ receptor antagonist MRS2578 (50 nM, *n* = 6) did not significantly change any of the urodynamic parameters (ICI, PTh, A and Δt) analysed (Figure 2). Interestingly, higher concentrations (100 and 300 nM) of the P2Y₆ receptor antagonist

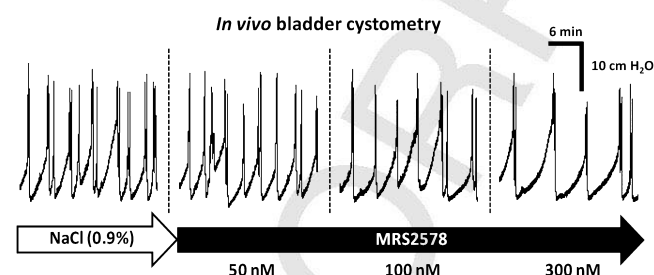


Figure 2

Concentration-dependent inhibition of the voiding frequency by the P2Y₆ receptor antagonist, MRS2578, during normal saline (0.9%-w/v of NaCl) infusion into the urinary bladder of urethane-anaesthetized rats. MRS2578 (50–300 nM) was applied in a cumulative manner into the bladder lumen by changing the content of the syringe connected to the automated perfusion system. Stable urodynamic responses to MRS2578 were reached in 10–15 min.

increased both the ICI and the PTh required to initiate the voiding reflex without significantly affecting the motor components (A and Δt) of the micturition reflex (Figure 2). The decrease in the voiding frequency (prolongation of the ICI) observed with MRS2578 infused into the bladder lumen at 100 and 300 nM concentrations was respectively 35 ± 9% (*n* = 5) and 53 ± 6% (*n* = 5). MRS2578 was even more effective at increasing the PTh to trigger the voiding reflex, by 59 ± 14% (*n* = 5) with 100 nM and 63 ± 8% (*n* = 5) with 300 nM. These results suggest that the afferent component of the micturition reflex in the rat *in vivo* is under the tonic control of UDP-sensitive P2Y₆ receptors activation because the affected urodynamic parameters, ICI and PTh, are normally associated with the filling sensitive phase of the reflex.

Participation of excitatory P2X₃ and inhibitory P2Y₁ receptors on UDP-induced increase in the voiding frequency in anaesthetized rats

The effects of UDP and its stable analogue, PSB0474, resembled the increase in the voiding frequency observed with ATP applied into the bladder lumen of anaesthetized animals (Pandita and Andersson, 2002), which is known to be predominantly mediated by P2X₃ receptors on sub-urothelial nerve afferents (Burnstock, 1999; Cockayne *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2008). Besides the relevance of sub-urothelial P2X₃ receptors to initiate the micturition reflex, blockade of P2Y₁ receptors may remove an accommodatory, inhibitory drive to the detrusor muscle in urethane-anaesthetized female rats (King *et al.*, 2004). In the human urinary bladder, ATP stimulation of bladder activity may be partly reversed by its catabolism by E-NTPDases to ADP, leading to the activation of inhibitory P2Y₁ receptors on cholinergic nerve endings (Silva *et al.*, 2011). In this context, we investigated the contribution of P2X₃ and P2Y₁ receptors to bladder hyperactivity caused by UDP (100 µM). I.v. application of the selective P2X₃ receptor antagonist, A317491 (100 nM), completely prevented the increase in the voiding frequency produced by UDP (100 µM) (Figure 3); A317491 (100 nM) was devoid of effects in the amplitude (A) and the duration (Δt) of voiding bladder contractions when applied together with UDP (100 µM) (see Figure 3A,B). When used alone, i.v. A317491 (100 nM) had no effects on the parameters evaluated during saline distension cystometry recordings in the anaesthetized rat. In the presence of the P2Y₁ receptor antagonist, MRS2179 (300 nM, applied i.v.), UDP (100 µM) increased, rather than decreased, the ICI (Figure 3A,B). Under these conditions, UDP-induced decrease in the voiding frequency may be, at least partly, due to a significant increase in the duration (Δt) of voiding contractions (Figure 3A,B).

Immunolocalization of P2Y₆, P2Y₁ and P2X₃ purinoceptors in urothelium and sub-urothelial layers of the rat urinary bladder

The presence of P2Y₆ receptors in the rat urinary bladder was demonstrated by immunofluorescence confocal microscopy using two distinct commercially available antibodies (Figure 4; for details, see Table 1). The antibody from Alomone Labs (APR-011) is directed against the intracellular

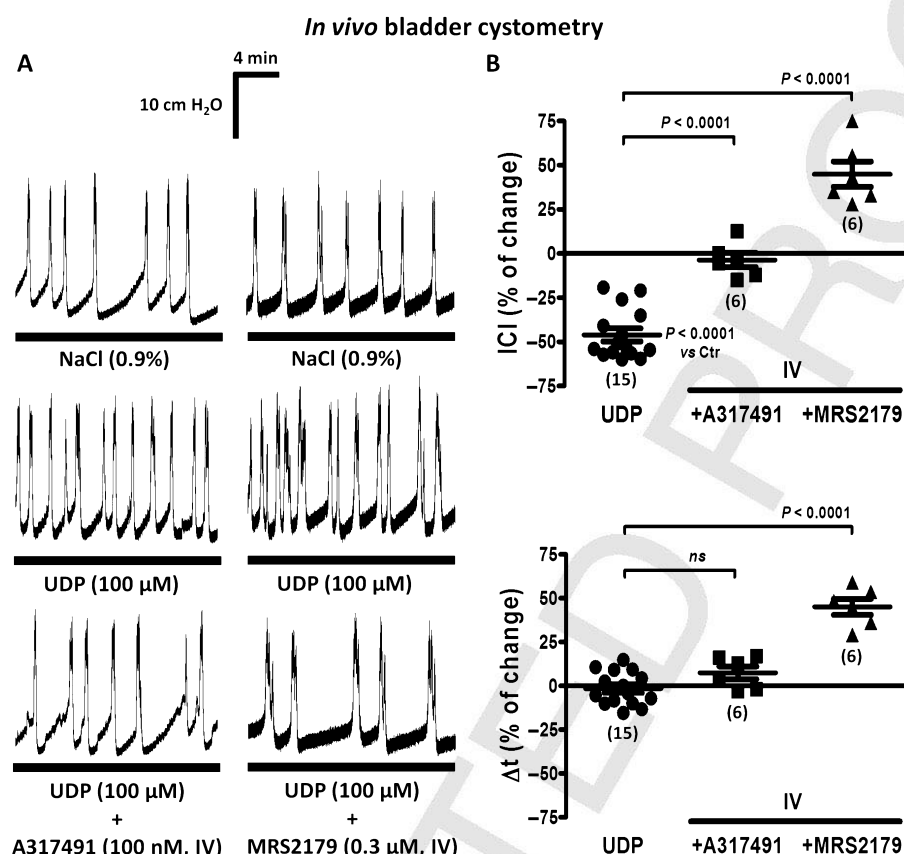


Figure 3

Modification of UDP (100 μM)-induced increase in the voiding frequency by i.v. application of A317491 (100 nM, a selective P2X3 receptor antagonist) and MRS2179 (0.3 μM, a P2Y₁ receptor antagonist) in the anaesthetized rat. (A) Bladder cystometry recordings during normal saline (0.9%-w/v of NaCl) infusion into the urinary bladder in the absence and in the presence of UDP (100 μM). A317491 (100 nM) and MRS2179 (0.3 μM) were continuously perfused through the catheter inserted into the left jugular vein starting at least 20 min before UDP application. (B) Scatter plots representing the percent change in the ICI and of the duration (Δt) of voiding contractions, compared with control values (Ctr, 0%). The vertical bars represent SEM of a *n* number of animals (shown in parenthesis). *P* values as shown; significantly different from UDP alone; unpaired Student's *t*-test with Welch's correction.

C-terminus domain of the rat P2Y₆ receptor; this antibody is considered highly specific for this species although in our hands it was also able to recognize P2Y₆ receptors in human bone marrow stromal cells (Noronha-Matos *et al.*, 2012). This antibody may lack specificity towards the mouse receptor as staining was not totally lacking in the P2Y₆ receptor knockout mouse (Yu and Hill, 2013). For this reason, we used another antibody from Antibodies Online (ABIN1386282), which was designed to recognize the human P2Y₆ receptor, while cross-reacting significantly with the rat receptor. Our data showed that the P2Y₆ receptor was most abundantly expressed in the urothelium (Figure 4A), although labelling was also observed in sub-urothelial cells staining positively for the intermediate filament protein vimentin (presumably myofibroblasts) (*cf.* Fry *et al.*, 2012; Sui *et al.*, 2006). The P2Y₆ receptor immunostaining was equally strong with either antibody, APR-011 or ABIN1386282. Pre-adsorption with the peptide corresponding to the amino acid sequence 311–328 of the rat P2Y₆ receptor abolished staining with the APR-011 antibody, while keeping the same acquisition settings on the confocal microscope (Figure 4A, bottom panels). Notably, we observed P2Y₆

receptor immunoreactivity in all layers of the urothelium including the terminally differentiated superficial umbrella cells which also stained positively with cytokeratin 20 (Figure 4A, upper panels).

We confirmed data from previous reports showing that P2X₃ and P2Y₁ receptor subtypes are expressed throughout the bladder epithelium of rats, rabbits, cats and humans (Elneil *et al.*, 2001; Birder *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005; see Burnstock, 2014) (Figure 5). Localization of P2X₃ and P2Y₁ immunoreactivity within the urothelium suggests an additional sensory role for these receptors in regulating uroepithelial function. According to the model of Wang *et al.* (2005) ATP released from the urothelium upon bladder filling acts through a diversity of P2 purinoceptors (including P2X₃ and P2Y₁, but also P2Y₆) expressed in the bladder epithelium to promote signal amplification to release the nucleotide and to stimulate apical membrane insertion in umbrella cells.

Interestingly, in light of our results on bladder urodynamics in the anaesthetized rat, we demonstrated the presence of ionotropic P2X₃ receptors on small sub-urothelial nerve fibres staining positively against the neurofilament 160

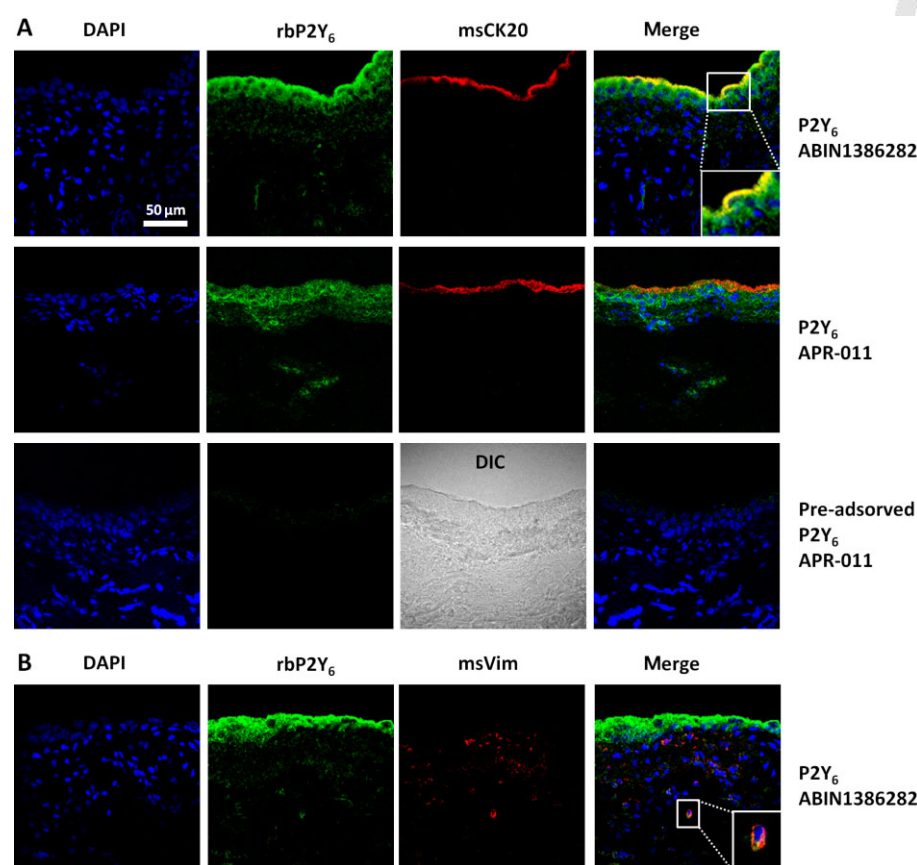


Figure 4

Immunolocalization of P2Y₆ receptors in the uroepithelium and sub-urothelial layers of transverse sections of the rat urinary bladder by confocal microscopy. Two distinct P2Y₆ receptor antibodies, APR-011 and ABIN1386282, were used as indicated. Terminally differentiated urothelial cells (umbrella cells) and sub-urothelial myofibroblasts are labelled with cytokeratin 20 (CK20, red, in panel A) and vimentin (Vim, red, in panel B) respectively. Nuclei are stained with DAPI (blue). Yellow staining denotes co-localization of P2Y₆ receptor (green) with CK20 (red) or Vim (red). Pre-adsorption with the peptide corresponding to the amino acid sequence 311–328 of the rat P2Y₆ receptor abolished staining with the APR-011 antibody. Differential interference contrast (DIC) image is shown for comparison in the latter condition. Scale bar = 50 μm.

(NF160) in the rat urinary bladder, although we were unable to show any P2Y₁ receptor immunoreactivity in NF160-labelled sub-urothelial nerve fibres using the same acquisition settings (Figure 5). These findings agree with the results suggesting that P2X3 receptors on sub-urothelial sensory nerves have a role in the purinergic mechanosensory transduction underlying initiation of voiding reflexes in rabbits and mice (Ferguson *et al.*, 1997; Cockayne *et al.*, 2000; Vlaskovska *et al.*, 2001), and sustain the hypothesis that P2Y₁ receptors play a predominant inhibitory role in the rat detrusor tone (King *et al.*, 2004).

UDP-induced hyperactivity requires intact bladder nervous circuitry

To evaluate the contribution of the extrinsic nervous circuitry to UDP-induced bladder hyperactivity, we recorded the myographic activity of the isolated rat urinary bladder *in vitro*. Although small-amplitude spontaneous detrusor twitching was detected, no voiding contractions were elicited upon bladder filling in conditions similar to those used in the *in vivo* cystometric assays (see Methods). When UDP (300 μM)

was applied through the catheter inserted inside the bladder, we observed no changes in the myographic recordings compared with the control situation where only Tyrode's solution was infused (Figure 6B,C). The frequency and the amplitude of spontaneous detrusor twitching increased significantly ($P < 0.05$) when UDP (300 μM) was added directly into the bathing solution outside the bladder wall (Figure 6C). Although the concentration of UDP used in myographic recordings *in vitro* was threefold higher (300 μM) than that required to increase bladder overactivity in the anaesthetized rat *in vivo*, the excitatory effect of UDP did not exceed 10% of the contractions produced by oxotremorine (30 μM) or α,β -methylene ATP (30 μM), which selectively activate muscarinic and P2X1 receptors in the detrusor smooth muscle respectively (data not shown).

Figure 6D shows confocal micrographs of transverse sections of rat urinary bladder detrusor muscle immunostained for P2Y₆ and P2X1 receptors. The greater contractile efficacy of the P2X1 receptor agonist, α,β -methylene ATP (30 μM), compared with UDP (300 μM), agrees with immunohistochemical studies showing that the P2X1 receptor is the dominant subtype in smooth muscle cell membranes of the rat

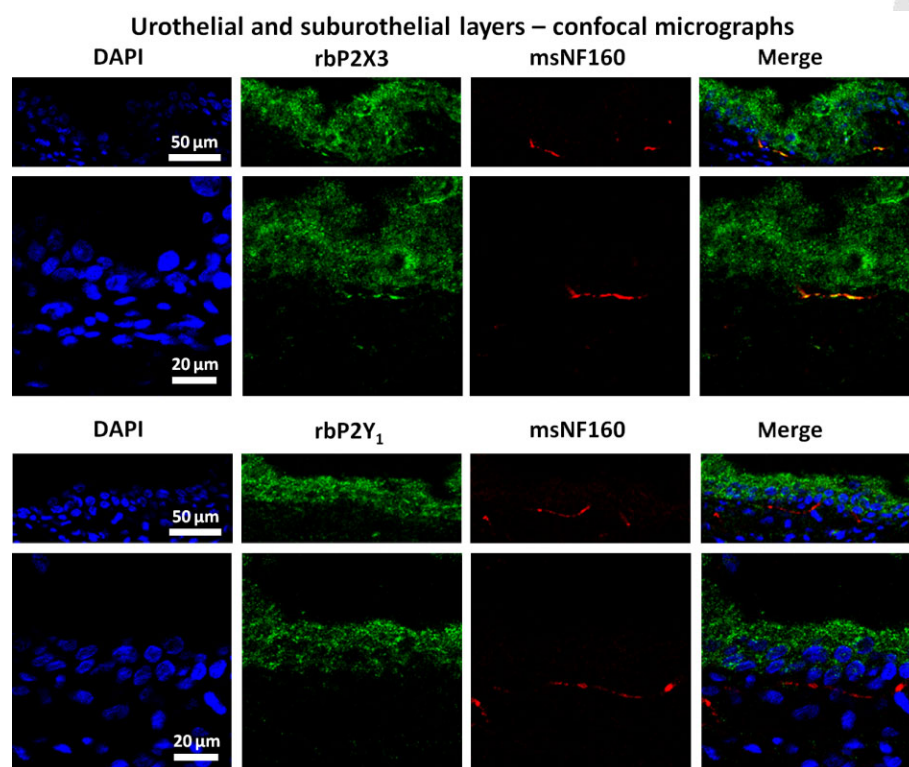


Figure 5

Immunolocalization of P2X₃ and P2Y₁ purinoceptors in the uroepithelium and sub-urothelial layer of transverse sections of the rat urinary bladder by confocal microscopy. Both, P2X₃ and P2Y₁, receptor subtypes are expressed throughout the bladder epithelium. P2X₃, but not P2Y₁, receptors (green) co-localize (yellow staining) with NF160 (red) labelling in small sub-urothelial nerve fibres. Nuclei are stained with DAPI (blue). Scale bars = 20 or 50 μm (as indicated).

detrusor (Lee *et al.*, 2000; see Figure 6D). Despite the small effect of direct application of UDP (300 μM) in to the bath on spontaneous contractions of the whole bladder *in vitro*, our data do not exclude the possibility that co-localized P2Y₆ receptors may enhance P2X₁-mediated contractions in the abnormal urinary bladder as previously suggested (Yu and Hill, 2013; Yu *et al.*, 2013). The point that we would emphasize is that effectiveness of urothelial P2Y₆ receptors requires extrinsic neuronal circuitry, as it was not detected in the isolated bladder *in vitro*, even though sub-urothelial myofibroblasts and intrinsic neuronal networks were preserved.

P2Y₆ receptor agonist, PSB0474, increases urinary ATP content

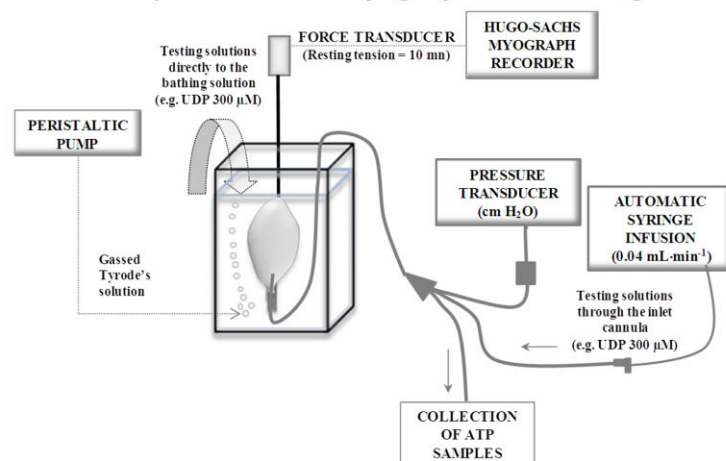
The increase in the voiding frequency caused by the P2Y₆ receptor agonist, PSB0474 (100 nM), was mimicked by the E-NTPDase inhibitor, ARL 67156 (100 μM), which increased urinary ATP levels when applied inside the bladder (Figure 7A). Infusion of PSB0474 (100 nM) through the catheter inserted into the bladder increased, by more than three-fold, the ATP content of the voided cystometry fluid evaluated by the luciferin-luciferase bioluminescence method (Figure 7B). No significant changes were observed in the LDH activity of samples collected before (7.3 ± 1.4 mU·mL⁻¹, $n = 5$) and after PSB0474 (100 nM, 8.0 ± 3.7 mU·mL⁻¹, $n = 5$) application.

UDP indirectly inhibits [³H]-ACh release from the stimulated urinary bladder: involvement of P2Y₆ and P2Y₁ receptors on urothelial cells and cholinergic nerves respectively

UDP (100 μM) significantly decreased [³H]-ACh release from rat urinary bladder preparations stimulated electrically (10 Hz, 200 pulses) (Figure 8A). The inhibitory effect of UDP (100 μM) was evident in intact bladder preparations, but not in those where the urothelium has been gently removed with a cotton swab (Figure 8B). Pretreatment of the preparations with the P2Y₆ receptor selective antagonist, MRS2578 (50 nM), blocked the inhibitory effects of UDP (100 μM) on transmitter release (Figure 8A). The inhibitory effect of UDP (100 μM) was transformed into facilitation upon blockade of P2Y₁ receptors with MRS2179 (300 nM), but only when the urothelium was left intact (Figure 8A).

Confocal microscopy studies demonstrated that the P2Y₆ receptor immunoreactivity did not co-localize with the vesicular ACh transporter (VACHT) in the detrusor muscle layer of the rat urinary bladder (Figure 9). This finding excludes a direct inhibitory action of UDP on ACh release from stimulated cholinergic nerve terminals. Immunohistochemical data support the hypothesis that UDP might exert an indirect effect operated by inhibitory P2Y₁ receptors localized on VACHT-positive cholinergic nerve terminals (Figure 9) via ADP resulting from the extracellular catabolism of ATP predominantly released from the urothelium.

A Setup for *in vitro* myographic recordings



B Spontaneous contractions of the whole bladder

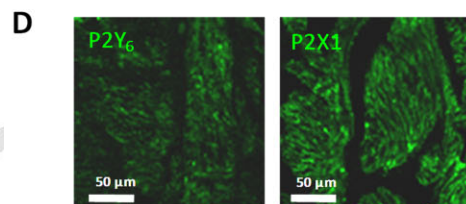
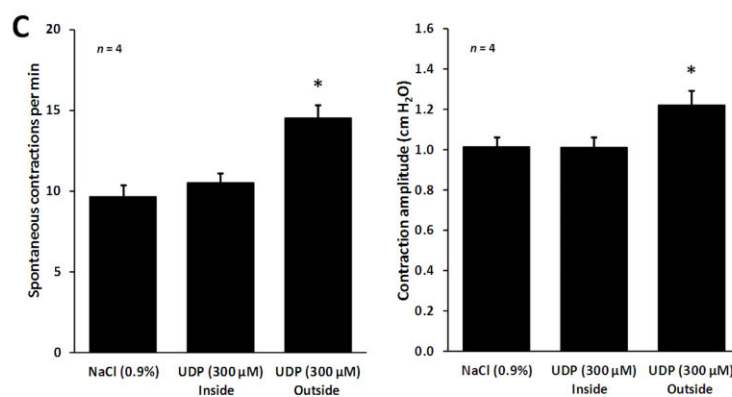
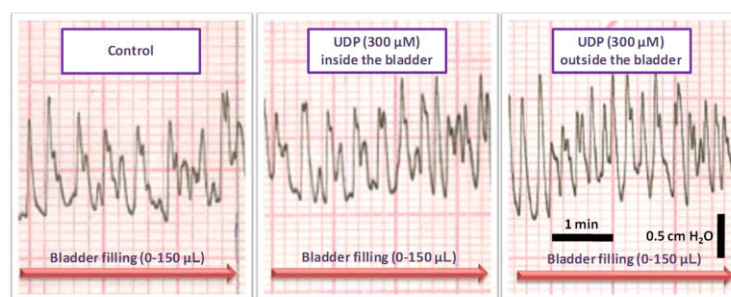


Figure 6

(A) Setup for myographic recordings of the whole urinary bladder of the rat *in vitro*. (B) Spontaneous contractile activity of the rat urinary bladder in response to bladder filling with Tyrode's solution, up to 150 μL , infused at a constant flow rate ($40 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) to mimic *in vivo* cystometry experiments. UDP ($300 \mu\text{M}$) was superfused either into the bladder lumen (by changing the syringe connected to the automated perfusion system) or directly to the bathing solution outside the bladder. (C) Quantification of the frequency and magnitude of spontaneous contractions of the whole bladder *in vitro* in the absence and in the presence of UDP ($300 \mu\text{M}$) applied inside and outside the bladder. The vertical bars represent SEM of four isolated bladders. $*P < 0.05$; significantly different from control (saline superfusion); one-way ANOVA followed by Dunnett's modified *t*-test. (D) Confocal micrographs of transverse sections of rat urinary bladder detrusor muscle immunostained for P2Y₆ (APR-011) and P2X1 (APR-001) receptors. Scale bars = $50 \mu\text{m}$.

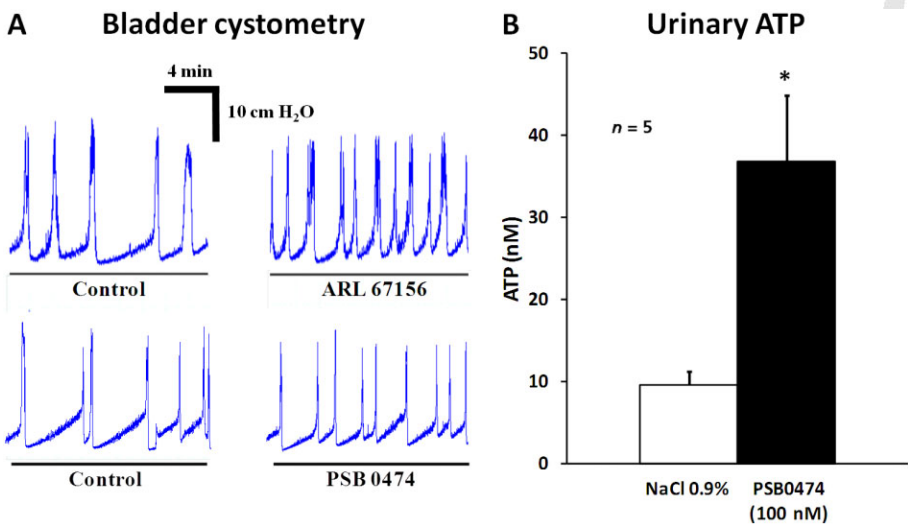


Figure 7
(A) Comparison of bladder cystometry recordings obtained during infusion of ARL 67156 (100 μ M, an E-NTPDase inhibitor) and PSB0474 (100 nM, a selective P2Y₆ receptor agonist) into the urinary bladder lumen of anaesthetized rats. (B) Intravesical infusion of PSB0474 (100 nM) increases ATP levels in the urinary fluid collected during cystometry recordings. The ATP content of the samples was quantified by the luciferin-luciferase bioluminescence assay. The vertical bars represent SEM of five animals. * $P < 0.05$; significantly different from control (saline infusion); one-way ANOVA followed by Dunnett's modified t -test.

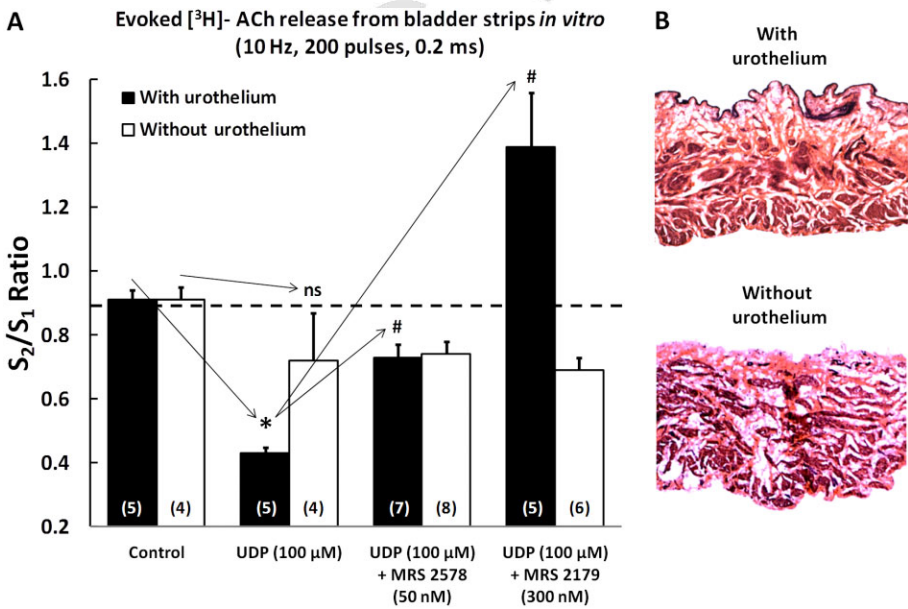


Figure 8
(A) Effect of UDP (100 μ M) on electrically-evoked [³H]-ACh release from intact urinary bladder strips and in preparations without the urothelium. UDP (100 μ M) was applied 8 min before S₂. MRS2578 (50 nM) and MRS2179 (300 nM) were added to the incubation media at the beginning of the release period (time zero) and were present throughout the assay, including S₁ and S₂. The ordinates represent evoked tritium outflow expressed by S₂/S₁ ratios, i.e. the ratio between the evoked [³H]-ACh release during the second period of stimulation (in the presence of UDP) and the evoked [³H]-ACh release during the first stimulation period (without UDP). The vertical bars represent SEM. * $P < 0.05$; significantly different from control; # $P < 0.05$; significantly different from UDP alone; unpaired Student's t -test with Welch's correction. (B) Representative microscopic images of rat urinary bladder strips stained with haematoxylin-eosin to confirm the presence or the absence of the urothelium. Magnification, 40 \times .

Smooth muscle layer - Intensity projections over Z axis (5-6 stacks)

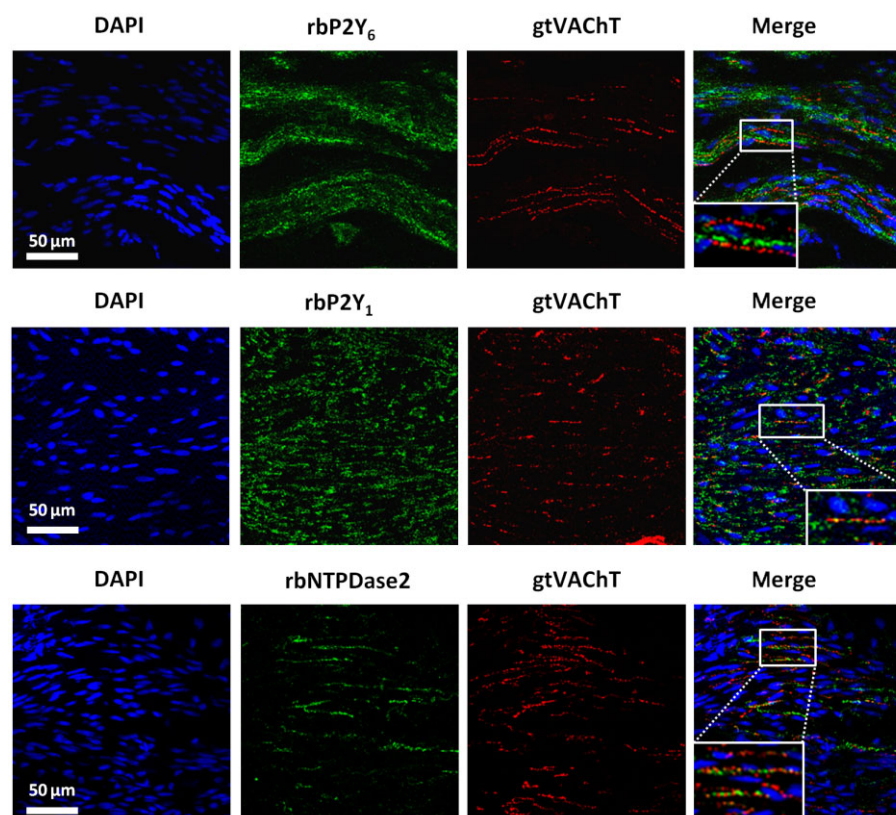


Figure 9

Confocal micrographs showing P2Y₆, P2Y₁ and NTPDase2 immunoreactivity in transverse sections of the detrusor smooth layer of rat urinary bladder. To facilitate visualization of small cholinergic nerve terminals staining for VAcHT (red) images correspond to the intensity projections over Z axis of five to six confocal microscopy stacks taken at the smooth muscle layer. No co-localization was found between P2Y₆ receptor (green) and VAcHT (red) immunoreactivity. Conversely, VAcHT-positive cholinergic nerve terminals (red) stained positively with antibodies against the P2Y₁ receptor and E-NTPDase2 (green); yellow staining denotes co-localization. Nucleic DNA is stained with DAPI (blue). Scale bars = 50 µm.

Histochemical studies of E-NTPDases in the rat bladder demonstrated that phosphate generated from resulting from the extracellular catabolism of ATP (30 µM) occurred predominantly in the urothelium, but was also detectable in the sub-urothelial and smooth muscle layers (Figure 10A). Interestingly, the extracellular catabolism of ADP (30 µM) was observed predominantly in the apical urothelium and in smooth muscle, but was minimal in the sub-urothelial layer (Figure 10B). Moreover, we found that VAcHT-positive cholinergic nerve terminals also stained positively with the antibody against E-NTPDase2 (Figure 9). Because E-NTPDase2 (CD39L1, ATPase, EC 3.6.1.3) is a nucleoside triphosphatase hydrolysing ATP 10–15 times more efficiently than ADP (Matsuoka and Ohkubo, 2004), the bladder neuromuscular synapse may accumulate ADP to the levels required to activate the P2Y₁ receptors on cholinergic nerve terminals which inhibit Ach release. Thus, blockade of these inhibitory P2Y₁ receptors with MRS2179 resulted in the amplification of evoked [³H]-Ach release from cholinergic nerve efferents (Figure 8A) and, consequently, may increase the duration (Δt) and/or the amplitude (A) of voiding contractions (Figure 3B) produced by UDP.

Discussion and conclusions

Urothelial cells are highly deformable and can increase several fold in size during bladder filling (Truschel *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2009). Mechanical distension of urothelial cells released significant amounts of ATP (and probably UTP) to initiate the micturition reflex and to stimulate membrane insertion at the apical pole of umbrella cells (Wang *et al.*, 2005). Upon binding to a diversity of P2 purinoceptors (including P2X3 and P2Y₁) expressed in uroepithelial cells, released ATP and/or its metabolites formed by membrane-bound ecto-NTPDases may trigger a self-regenerating purinergic wave propagating to sub-urothelial myofibroblasts and sensory nerve fibres to initiate the voiding reflex. Immunofluorescent confocal microscopy data from this study demonstrated that P2Y₆ receptors were abundantly expressed in the urothelium of the rat urinary bladder, including the highly differentiated superficial umbrella cells. These receptors have also been reported in sub-urothelial myofibroblasts and detrusor smooth muscle fibres (see Sui *et al.*, 2006; Yu and Hill, 2013; Yu *et al.*, 2013). To our knowledge, this is the first report showing that the UDP-sensitive P2Y₆ receptor is an

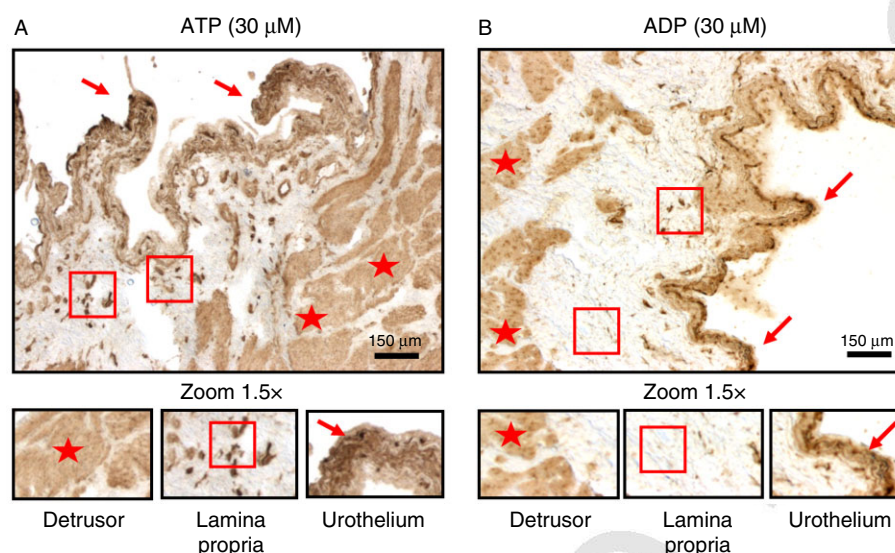


Figure 10

Histochemical E-NTPDase activity in the rat urinary bladder. Phosphate deposition resulting from extracellular catabolism of ATP (30 μM, A) was found predominantly in the urothelium (arrows), but was also present in the sub-urothelial (square) and smooth muscle (star) layers: Extracellular ADP (30 μM, B) was dephosphorylated predominantly in apical urothelial cells (arrows) and in the smooth muscle (stars), but only at very low levels in the sub-urothelial layer (square). These details are better appreciated in the higher magnification (1.5×) images in the lower panels. Scale bars = 150 μm.

important player in the mechanosensory purinergic pathway initiated by distension of epithelial cells, leading to increases in the voiding frequency in rats by promoting the release of ATP from the urothelium (Figure 11). A similar effect was found in the human urinary bladder (Silva-Ramos *et al.*, 2012).

Large amounts of extracellular ATP may leak from injured cells, but the mechanism of ATP release from urothelial cells under physiological conditions is still unresolved. Nucleotides-releasing pathways in intact cells include (1) electrodiffusional translocation via connexin- and pannexin-containing hemichannels and voltage-dependent anion channels; (2) facilitated diffusion by nucleotide-specific ATP-binding cassette transporters; and (3) vesicle exocytosis (Knight *et al.*, 2002; reviewed in Burnstock, 2006). In this study, ATP release from the urothelium was not due to cell damage because we detected no significant changes in the activity of the intracellular enzyme, LDH, in the voiding fluid. Recent data from our group point to a significant role of pannexin-1 containing hemichannels on P2Y₆ receptor-mediated ATP release to control bladder urodynamics in the anaesthetized rat (unpubl. obs.). Further studies are required to investigate whether this is the only mechanism involved and whether changes in this pathway occur under the conditions of the overactive bladder, along with altered expression of P2 purinoceptors (Birder *et al.*, 2004).

Our data provided functional and biochemical evidence that activation of P2Y₆ receptors increased the voiding frequency in the anaesthetized rat, indirectly, by releasing ATP from the urothelium. Fry *et al.* (2012) showed that sub-urothelial myofibroblasts were supersensitive to stretch-released ATP from the urothelium giving rise to augmented intrinsic spontaneous contractions of the urinary bladder in

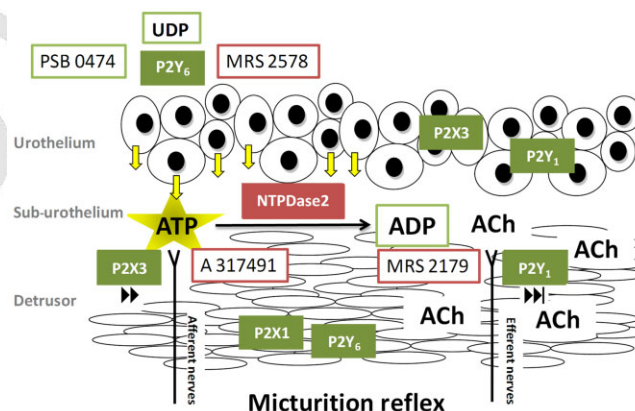


Figure 11

Schematic representation of the putative mechanisms underlying the control of the voiding frequency by urothelial UDP-sensitive P2Y₆ receptors in the anaesthetized rat. Activation of P2Y₆ receptors on distended umbrella cells during bladder filling increased, by three-fold, the release of ATP from the urothelium. Released ATP, acting via multiple urothelial P2 purinoceptors, triggers a self-regenerating purinergic wave propagating to sensory nerve afferents endowed with P2X3 receptors to initiate the voiding reflex. Bladder activity may be partly reversed by the hydrolysis of ATP into ADP by E-NTPDases, namely E-NTPDase2 located in the lamina propria (probably on interstitial cells) and on cholinergic nerve efferents. ADP accumulation at the neuromuscular synapse decreases ACh release and smooth muscle contraction through the activation of prejunctional inhibitory P2Y₁ receptors. The diagram also shows the locus of action of the main drugs used in this study.

spinal cord transected rats. Interestingly, they also showed that stretch-induced bladder hyperactivity in these animals may be decreased by the P2Y₆ receptor antagonist, MRS2578, but they needed a 100-fold higher (10 µM) concentration of the antagonist. Although the expression of UTP-sensitive P2Y₂ (and P2Y₄) receptors has been shown by real-time PCR, Western blotting and immunocytochemistry at the rat urothelium (see Chopra *et al.*, 2008), activation of these receptors might play a minor role under the present conditions because MRS2578 displays no activity at P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ and P2Y₁₁ receptors at concentrations below 10 µM (Mamedova *et al.*, 2004).

It is known that stimulation of high-threshold sub-urothelial nerve afferents containing ionotropic P2X₃ receptors by ATP released from the urothelium is involved in the micturition reflex following urine bladder distention (Burnstock, 1999; Cockayne *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2008). Non-neuronal (urothelial) localization of P2X₃ receptors supports the idea that in addition to stimulating sensory afferent nerves, ATP may play additional roles to regulate urothelial function. Here we showed that selective blockade of P2X₃ receptors with i.v. A317491 prevented the increase in the voiding frequency produced by UDP-sensitive P2Y₆ receptor activation in the rat *in vivo*. As UDP does not bind to ionotropic P2X purinoceptors, these results indicate that increases in the voiding frequency triggered by P2Y₆ receptors may be indirectly mediated via P2X₃ receptors on neighbouring uroepithelial cells and/or sub-urothelial sensory nerve fibres by ATP released from the urothelium. Proximity of sub-urothelial nerve fibres to blood vessels of the lamina propria makes it more likely any interference with the micturition reflex caused by i.v. application of the P2X₃ receptor antagonist, but one cannot exclude an effect of this drug on the urothelial self-propagating purinergic wave.

In spite of our findings demonstrating that activation of P2Y₆ receptors by UDP or its stable analogue, PSB0474, applied into the bladder lumen, increased the voiding frequency, we failed to detect changes in the motor components of the micturition reflex, both the amplitude (A) and the duration (Δt) of the voiding contractions. This contrasts with the findings of Yu *et al.* (2013) who demonstrated that P2Y₆ receptors synergise with P2X₁ receptors to increase bladder smooth muscle tone. Using myographic recordings in the isolated bladder *in vitro*, we confirmed that UDP increased the frequency and the amplitude of spontaneous detrusor twitching, a situation that required application of a threefold higher concentration (300 µM) of UDP directly outside the bladder wall, but was not detected when the nucleotide was infused into the bladder lumen. Even so, increments on spontaneous detrusor twitching caused by UDP (300 µM) were minimal (less than 10%) when compared with the effects of oxotremorine (30 µM) and α,β-methylene ATP (30 µM), which selectively activate muscarinic and P2X₁ receptors in the detrusor smooth muscle respectively. Thus, compared with UDP-induced increases in the voiding frequency that implicate the sequential activation of urothelial P2Y₆ receptors and ATP release leading to stimulation of urothelial/sub-urothelial P2X₃ receptors, direct activation of detrusor smooth muscle via co-expressed P2Y₆ and P2X₁ receptors might represent a minor component of UDP urodynamic response at least under the present experimental conditions.

Bladder overactivity may be partly reversed through the hydrolysis of ATP into ADP by E-NTPDases. Previous reports from our group demonstrated that ADP acts through inhibitory P2Y₁ receptors to decrease nerve-evoked ACh release in the human bladder (Silva *et al.*, 2011). Here, we showed that VAcHT-positive cholinergic nerve efferents to the detrusor, but not NF160-labelled sub-urothelial sensory nerves, exhibit immunoreactive P2Y₁ receptors. Upon blocking P2Y₁ receptors with i.v. MRS2179, UDP increased rather than decreased the ICI and enhanced the duration (Δt) of the voiding contractions. Thus, blockade of P2Y₁ receptors may unravel an effect of the nucleotide on the motor component of the micturition reflex. In fact, UDP acting via P2Y₆ receptors decreases [³H]-ACh release from rat urinary bladder strips stimulated electrically, but this effect was observed only if the urothelium was left intact. Blockade of ADP-sensitive P2Y₁ receptors with MRS2179 converted the inhibitory effects of UDP on ACh release into a facilitatory action, but only in those preparations with urothelium. These findings convincingly indicated that the increase in the voiding frequency produced by UDP was partly reversed by the activation of inhibitory P2Y₁ receptors on cholinergic nerve efferents.

ADP resulting from the extracellular catabolism of ATP released from the urothelium may be the endogenous activator of P2Y₁ receptors in the urinary bladder. By histochemical analysis of the E-NTPDase activity in the rat urinary bladder *in situ*, we found that the dephosphorylation of ATP occurred predominantly in the urothelium, but was also detectable in the sub-urothelial and smooth muscle layers, whereas the further hydrolysis of ADP was observed predominantly in the superficial layer of the urothelium and in the smooth muscle. These findings are consistent with the results obtained by Yu *et al.* (2011) in the mouse urinary bladder. They demonstrated that, in contrast to the urothelial layer, which is rich in E-NTPDase3 (and 8)-positive cells, only the E-NTPDase2 subtype is significantly expressed in the lamina propria (probably in interstitial cells of Cajal, see Yu *et al.*, 2012) as well as in cells in close proximity to smooth muscle bundles. As E-NTPDase2 is a nucleoside triphosphatase and hydrolyses ATP 10 to 15 times more efficiently than ADP (Matsuoka and Ohkubo, 2004), this might explain why ADP hydrolysis was only minimal in the sub-urothelium. Therefore, it is reasonable to suppose that ADP generated from ATP released from the urothelium may reach its target, the P2Y₁ receptor, on cholinergic nerve efferents. In addition, we found that VAcHT-positive cholinergic nerve terminals innervating the detrusor also express E-NTPDase2 immunoreactivity. As ATP is co-released with ACh in most cholinergic synapses, the bladder neuromuscular synapse may be able to accumulate ADP to the levels required to activate inhibitory P2Y₁ receptors on cholinergic nerve terminals. From the histochemical analysis, it is also likely that the ATP levels measured in the voiding fluid might have been underestimates of the amounts released because of the hydrolysis of this nucleotide by E-NTPDases bound to urothelial cells, during bladder filling.

Unlike the well-recognized extracellular signalling role of ATP, little is known about the UTP and UDP release within the bladder wall. The observation that blockade of UDP-sensitive P2Y₆ receptors with MRS2578 (100 and 300 nM, IC₅₀ value for the rat P2Y₆ receptor is 98 nM) increased the ICI and

the PTh that is required to initiate the voiding reflex during bladder filling in the anaesthetized rat demonstrated that either UTP or UDP was endogenously released and modulated the micturition reflex. Further studies are required to investigate which of these nucleotides is actually being released, because the latter could be generated from the former through E-NTPDases. Given that blockade of the P2Y₆ receptor tonus was more effective in the filling phase, rather than the contractile phase, of the micturition cycle, it is possible that urothelium and/or the sub-urothelial layer, including afferent nerves and/or myofibroblasts, would be the most likely production sites of UTP and UDP.

In conclusion, this study provides strong evidence that activation of P2Y₆ receptors increased the voiding frequency in the anaesthetized rat, indirectly, by releasing ATP from the urothelium and subsequent activation of P2X3 receptors on sub-urothelial sensory nerve fibres. Under these circumstances, bladder hyperactivity may be partly reversed through the hydrolysis of ATP into ADP by E-NTPDases, which through the activation of inhibitory P2Y₁ receptors might then inhibit ACh release from stimulated nerve efferents (Figure 11). Although we do not know at this stage whether UDP-sensitive P2Y₆ receptors play any prominent role in overactive bladder or painful bladder syndromes in humans, we have recently confirmed that activation of P2Y₆ receptors favours ATP release from strips of the human urothelium (unpublished work; Silva-Ramos *et al.*, 2012;).

Acknowledgements

The authors wish to thank Drs Nuno Silva, Diogo Monteiro and José Marinho for their collaboration in some *in vitro* experiments. We also thank Mrs. Maria Helena Costa e Silva and Belmira Silva for their valuable technical assistance. This research was partially supported by Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT projects PTDC/SAU-OSM/104369/2008 and Pest/OE/UI0215/2011), Associação Portuguesa de Urologia and the University of Porto/Caixa Geral de Depósitos (Investigação Científica na Pré-Graduação).

Conflict of interest

None.

References

- Alexander SPH, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Sharman JL, Catterall WA *et al.* (2013a). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: Ligand-Gated Ion Channels. *Br J Pharmacol* 170: 1582–1606.
- Alexander SPH, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Sharman JL, Spedding M *et al.* (2013b). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: G Protein-Coupled Receptors. *Br J Pharmacol* 170: 1459–1581.
- Birder LA, Ruan HZ, Chopra B, Xiang Z, Barrick S, Buffington CA *et al.* (2004). Alterations in P2X and P2Y purinergic receptor expression in urinary bladder from normal cats and cats with interstitial cystitis. *Am J Physiol Renal Physiol* 287: F1084–F1091.
- Burnstock G (1999). Release of vasoactive substances from endothelial cells by shear stress and purinergic mechanosensory transduction. *J Anat* 194: 335–342.
- Burnstock G (2006). Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacol Rev* 58: 58–86.
- Burnstock G (2014). Purinergic signalling in the urinary tract in health and disease. *Purinergic Signal* 10: 103–155.
- Chopra B, Gever J, Barrick SR, Hanna-Mitchell AT, Beckel JM, Ford AP *et al.* (2008). Expression and function of rat urothelial P2Y receptors. *Am J Physiol Renal Physiol* 294: F821–F829.
- Cockayne DA, Hamilton SG, Zhu QM, Dunn PM, Zhong Y, Novakovic S *et al.* (2000). Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X3-deficient mice. *Nature* 407: 1011–1015.
- El-Tayeb A, Qi A, Müller CE (2006). Synthesis and structure-activity relationships of uracil nucleotide derivatives and analogues as agonists at human P2Y₂, P2Y₄, and P2Y₆ receptors. *J Med Chem* 49: 7076–7087.
- Elneil S, Skepper JN, Kidd EJ, Williamson JG, Ferguson DR (2001). Distribution of P2X1 and P2X3 receptors in the rat and human urinary bladder. *Pharmacology* 63: 120–128.
- Ferguson DR, Kennedy I, Burton TJ (1997). ATP is released from rabbit urinary bladder epithelial cells by hydrostatic pressure changes – a possible sensory mechanism? *J Physiol (London)* 505: 503–511.
- Fry CH, Rossen A (2007). Urothelial targets in the overactivity bladder. *J Urol Urogynäk* 1: 20–23.
- Fry CH, Sui GP, Kanai AJ, Wu C (2007). The function of suburothelial myofibroblasts in the bladder. *Neurourol Urodyn* 26: 914–919.
- Fry CH, Young HS, Jabr RI, McCarthy C, Ikeda Y, Kanai AJ (2012). Modulation of spontaneous activity in the overactive bladder: the role of P2Y agonists. *Am J Physiol Renal Physiol* 302: F1447–1454.
- Honda M, Takenaka A, Inoue S, Chancellor MB, Yoshimura N (2012). Sensory neurone-specific receptor-mediated regulation of micturition reflex in urethane-anaesthetized rats. *BJU Int* 109: 628–633.
- Ito K, Iwami A, Katsura H, Ikeda M (2008). Therapeutic effects of the putative P2X3/P2X2/3 antagonist A-317491 on cyclophosphamide-induced cystitis in rats. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 377: 483–490.
- Keiding R, Hørde M, Gerhard W, Denmark E (1974). Recommended methods for the determination of four enzymes in blood. *Scand J Clin Lab Invest* 1: 271–274.
- Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010). Animal research: reporting *in vivo* experiments: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol* 160: 1577–1579.
- King BF, Knowles ID, Burnstock G, Ramage AG (2004). Investigation of the effects of P2 purinoceptor ligands on the micturition reflex in female urethane-anaesthetized rats. *Br J Pharmacol* 142: 519–530.
- Knight GE, Bodin P, de Groat WC, Burnstock G (2002). ATP is released from guinea pig ureter epithelium on distension. *Am J Physiol Renal Physiol* 282: F281–F288.
- Kumar V, Chapple CC, Chess-Williams R (2004). Characteristics of adenosine triphosphate release from porcine and human normal bladder. *J Urol* 172: 744–747.

- 1 Lee H-Y, Bardini M, Burnstock G (2000). Distribution of P2X
2 receptors in the urinary bladder and ureter of the rat. *J Urol* 163:
3 2002–2007.
- 4 Mamedova LK, Joshi BV, Gao ZG, von Kügelgen I, Jacobson KA
5 (2004). Diisothiocyanate derivatives as potent, insurmountable
6 antagonists of P2Y₆ nucleotide receptors. *Biochem Pharmacol* 67:
7 1763–1770.
- 8 Matsuoka I, Ohkubo S (2004). ATP- and adenosine-mediated
9 signaling in the central nervous system: adenosine receptor
10 activation by ATP through rapid and localized generation of
11 adenosine by ecto-nucleotidases. *J Pharmacol Sci* 94: 95–99.
- 12 McGrath J, Drummond G, McLachlan E, Kilkenny C, Wainwright C
13 (2010). Guidelines for reporting experiments involving animals: the
14 ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol* 160: 1573–1576.
- 15 Noronha-Matos JB, Costa MA, Magalhães-Cardoso MT, Ferreirinha
16 F, Pelletier J, Freitas R *et al.* (2012). Role of ecto-NTPDases on
17 UDP-sensitive P2Y₆ receptor activation during osteogenic
18 differentiation of primary bone marrow stromal cells from
19 postmenopausal women. *J Cell Physiol* 227: 2694–2709.
- 20 Pandita RK, Andersson KE (2002). Intravesical adenosine
21 triphosphate stimulates the micturition reflex in awake, freely
22 moving rats. *J Urol* 168: 1230–1234.
- 23 Ruggieri MR Sr (2006). Mechanisms of disease: role of purinergic
24 signaling in the pathophysiology of bladder dysfunction. *Nat Clin
25 Pract Urol* 3: 206–215.
- 26 Silva I, Correia J, Ferreirinha F, Magalhães-Cardoso MT, Silva-Ramos
27 M, Sévigny J *et al.* (2011). Bladder overactivity due to global
28 impairment of ecto-NTPDases in humans with lower urinary tract
29 disorders exhibiting unbalanced ATP / adenosine formation. *Auton
30 Neurosci Basic Clinical* 163: 49–50.
- 31 Silva-Ramos M, Silva I, Timoteo MA, Carneiro I, Vieira C, Silva N
32 *et al.* (2012). UDP-sensitive P2Y₆ receptors play a dual role in the
33 human urinary bladder indirectly via the release of ATP from
34 urothelium. *NeuroUrol Urodyn* 31: 1023.
- Silva-Ramos M, Silva I, Oliveira O, Ferreira S, Reis MJ, Oliveira JC
et al. (2013). Urinary ATP may be a dynamic biomarker of detrusor
overactivity in women with overactive bladder syndrome. *PLoS
ONE* 8: e64696.
- Sui GP, Wu C, Fry CH (2006). Characterization on the purinergic
receptor subtype on guinea-pig suburothelial myofibroblasts. *BJU
Int* 97: 1327–1331.
- Truschel ST, Wang E, Ruiz WG, Leung SM, Rojas R, Lavelle J *et al.*
(2002). Stretch-regulated exocytosis/endocytosis in bladder umbrella
cells. *Mol Biol Cell* 13: 830–846.
- Vlaskovska M, Kasakov L, Rong W, Bodin P, Bardini M, Cockayne
DA *et al.* (2001). P2X₃ knock-out mice reveal a major sensory role
for urothelially released ATP. *J Neurosci* 21: 5670–5677.
- Wang EC, Lee JM, Ruiz WG, Balestreire EM, von Bodungen M,
Barrick S *et al.* (2005). ATP and purinergic receptor-dependent
membrane traffic in bladder umbrella cells. *J Clin Invest* 115:
2412–2422.
- Yu W, Hill WG (2013). Lack of specificity shown by P2Y₆ receptor
antibodies. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 386: 885–891.
- Yu W, Khanderwal P, Apodaca G (2009). Distinct apical and
basolateral membrane requirements for stretch-induced membrane
traffic at the apical of bladder umbrella cells. *Mol Biol Cell* 20:
282–295.
- Yu W, Robson SC, Hill WG (2011). Expression and distribution of
ectonucleotidases in mouse urinary bladder. *PLoS ONE* 6: e18704.
- Yu W, Zeidel ML, Hill WG (2012). Cellular expression profile for
interstitial cells of Cajal in bladder – a cell often misidentified as
myocyte or myofibroblast. *PLoS ONE* 7: e48897.
- Yu W, Sun X, Robson SC, Hill WG (2013). Extracellular UDP
enhances P2X-mediated bladder smooth muscle contractility via
P2Y₆ activation of the phospholipase C/inositol trisphosphate
pathway. *FASEB J* 27: 1895–1903.

Anexo 2



Pulmonary, Renal and Hepatic Pharmacology

ATP released *via* pannexin-1 hemichannels mediates bladder overactivity triggered by urothelial P2Y₆ receptors



M. Alexandrina Timóteo^{a,1}, Inês Carneiro^{a,1}, Isabel Silva^a, José Bernardo Noronha-Matos^a, Fátima Ferreirinha^a, Miguel Silva-Ramos^{a,b}, Paulo Correia-de-Sá^{a,*}

^aLaboratório de Farmacologia e Neurobiologia/UMIB, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar—Universidade do Porto (ICBAS-UP), Porto, Portugal

^bServiço de Urologia, Centro Hospitalar do Porto (CHP), Porto, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 September 2013

Accepted 13 November 2013

Available online 22 November 2013

Keywords:

Urothelium

Micturition reflex

Anaesthetized rat

P2Y₆ receptor

ATP release

Pannexin hemichannels

ABSTRACT

In contrast to the well-known signaling role of urothelial ATP to control bladder function, the hypothesis that uracil nucleotides (UTP and/or UDP) also exert autocrine/paracrine actions only recently gained experimental support. Urothelial cells express UDP-sensitive P2Y₆ receptors, yet their role in the control of bladder activity has been mostly neglected. This study was designed to investigate the ability of PSB0474, a stable UDP analogue which exhibits selectivity for P2Y₆ receptors, to modulate urodynamic responses in the anaesthetized rat *in vivo*. Instillation of PSB0474 into the bladder increased the voiding frequency (VF) without affecting the amplitude (A) and the duration (Δt) of bladder contractions. PSB0474-induced bladder overactivity was prevented by the selective P2Y₆ antagonist, MRS2578. The increase in the VF produced by PSB0474 was also blocked by inhibitors of pannexin-1 hemichannels, ¹⁰Panx or carbenoxolone, when these drugs were applied inside the bladder lumen but not when they were administered intravenously. Reduction of hemichannels pore permeability with H1152 also prevented PSB0474-induced bladder overactivity, but the exocytosis inhibitor, Exo-1, was inactive. PSB0474 increased by 3-fold the urinary ATP content. Implication of hemichannels permeability on PSB0474-induced ATP release was demonstrated by real-time fluorescence video-microscopy measuring the uptake of propidium iodide by intact urothelial cells in the absence and in the presence of MRS2578 or carbenoxolone. Confocal microscopy studies confirmed the co-localization of pannexin-1 and P2Y₆ receptors in the rat urothelium. Data indicate that activation of P2Y₆ receptors causes bladder overactivity in the anaesthetized rat indirectly by releasing ATP from the urothelium *via* pannexin-1 hemichannels.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

ATP released from urothelial cells during bladder distention is a prime mediator to initiate the voiding reflex *via* the activation of P2X₃ receptors on suburothelial sensory nerve fibers [1,2]. The nucleotide may be also involved in the voiding phase of the micturition reflex since it is released as a cotransmitter with acetylcholine from parasympathetic nerves supplying the bladder (reviewed in [3]). At the detrusor neuromuscular synapse, ATP

exerts mutually exclusive effects through the activation of excitatory P2X₁ receptors on the detrusor smooth muscle and of inhibitory P2Y₁ receptors controlling acetylcholine release from cholinergic nerve endings, after its catabolism into ADP by E-NTPDases [4]. Recently, evidence has emerged in support of a purinergic role of suburothelial myofibroblasts in detrusor contraction [5]. Interestingly, intravesical ATP stimulates the micturition reflex in awake, freely moving rats leading to decreases in bladder capacity and voided volume, with limited effects on detrusor tension [6], suggesting that ATP exerts a more prominent role on the sensory component of the micturition reflex. This scenario may change dramatically in many urological diseases where the abnormal production, release and metabolism of ATP, together with altered expression of various P2 purinoceptors, are common features [7,8]. Increase in the purinergic tone of the bladder has been associated with interstitial cystitis, detrusor overactivity, outlet obstruction, inflammation, neurogenic bladder, spinal cord lesions and aging. In this context, our group

Abbreviations: ABC, ATP-binding cassette transporters; Cx43, connexin 43; E-NTPDases, ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases; LDH, lactate dehydrogenase; mRNA, messenger ribonucleic acid; Panx1, pannexin-1; TTX, tetrodotoxin; UDP, uridine diphosphate; UTP, uridine triphosphate.

* Corresponding author.

E-mail addresses: farmacol@icbas.up.pt, pcorreiasa@mail.telepac.pt (P. Correia-de-Sá).

¹ These authors contributed equally to this work.

convincingly demonstrated that urinary ATP may be a dynamic biomarker of detrusor activity in women with overactive bladder syndrome [9].

In contrast to the compelling evidence for the extracellular signaling role of ATP, recent studies suggest that uracil nucleotides may also play an autocrine/paracrine role to control bladder function [10]. UDP-sensitive P2Y₆ receptors have been implicated in the generation of large spontaneous contractions and propagating waves of intracellular Ca²⁺ and membrane depolarization originated in suburothelial myofibroblasts and spreading to the detrusor smooth muscle in rats submitted to spinal cord transection [11]. Furthermore, Yu and collaborators using myographic recordings demonstrated that UDP, acting on P2Y₆ receptors, interplays with P2X1 receptors in a synergistic manner to increase bladder smooth muscle tone [12]. Despite the signaling effects of P2Y₆ receptors in suburothelial myofibroblasts and detrusor smooth muscle fibers, we were intrigued by the observation that this receptor is most abundantly expressed in urothelial cells with only a discrete labeling in the suburothelial layer (see e.g. [13]), but no data has been produced to date regarding its role in the urothelium to control bladder function. Therefore, this study was designed to investigate the ability of PSB0474, an enzymatically-stable UDP analogue which exhibits selectivity for P2Y₆ receptors [14], to modulate bladder activity in the anesthetized rat *in vivo*.

Data from this study indicate that activation of P2Y₆ receptors causes bladder overactivity indirectly by releasing ATP from the urothelium. Notwithstanding its relevance to control bladder function in normal and abnormal conditions, the mechanism of ATP release from urothelial cells is still unresolved. Huge amounts of extracellular ATP may leak from injured cells. On the other hand, intact cells may release ATP (and presumably uracil nucleotides) through (1) electrodiffusional translocation *via* connexin- and pannexin-containing hemichannels and voltage-dependent anion channels, (2) facilitated diffusion by nucleotide-specific ATP-binding cassette (ABC) transporters, and (3) vesicle exocytosis (reviewed in [15]). Notably, the urinary bladder is among the tissues expressing the higher amounts of pannexin-1 mRNA in the body [16]. Moreover, pannexin-1 channels activity can be modulated by mechanical stretch, membrane potential, cytoplasmic Ca²⁺ concentration [17,18], RhoA/Rho kinase activation (and subsequent myosin light chain phosphorylation) [19], and, most importantly within the context of this study, *via* the activation of purinoceptors [17,20–22]. These findings prompted us to investigate the involvement of hemichannels on P2Y₆-induced bladder overactivity using specific pharmacological inhibitors.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male rats (Wistar, 300–450 g) (Charles River, Barcelona, Spain) were kept at a constant temperature (21 °C) and a regular light (06.30–19.30 h)–dark (19.30–06.30 h) cycle, with food and water *ad libitum*. Animal handling and experiments were in accordance with the guidelines prepared by Committee on Care and Use of Laboratory Animal Resources (National Research Council, USA) and followed the European Communities Council Directive (86/609/EEC). All the animals included in this study were submitted to the same experimental procedure.

2.2. In vivo cystometric recordings

The experiments were carried out in urethane-anaesthetized rats (1.0–1.2 g kg^{−1}), spontaneously breathing. Core body temperature

was kept between 36 °C and 38 °C with the help of a heating pad controlled by a thermosensor connected to a rectal probe. A catheter connected to an injection pump was inserted into the left jugular vein to permit normal saline (0.90% w/v of NaCl) infusion (4 ml h^{−1} kg^{−1}) and intravenous drugs application. After exposing the urinary bladder through a median abdominal incision, a three-barrel catheter was inserted through its dome. One barrel, was connected to an automate perfusion pump for saline and/or drugs infusion; a second barrel, was attached to a pressure transducer for continuous monitoring of intravesical pressure; the third barrel was used either to drain or to close the bladder circuit in order to initiate the micturition reflex. The bladder pressure was continuously monitored on a computer screen with a PowerLab data acquisition system (Chart 5, version 4.2 software; AD Instruments, USA), which was also used to monitor hemodynamic and respiratory parameters in the anaesthetized rat.

After surgical preparation, a 60-min equilibration period was undertaken during which normal saline (0.90% w/v of NaCl) was infused into the urinary bladder at 0.04 ml min^{−1} and allowed to freely drain out of the bladder (open circuit). The micturition reflex was initiated by closing the draining barrel while keeping intravesical infusion of saline at a constant rate (0.04 ml min^{−1}). Voiding contractions were assumed as large-amplitude rhythmic bladder contractions accompanied by urine draining through the urethra when bladder pressure reached a certain threshold (see Fig. 1A). The intercontraction interval (ICI, min) and the pressure threshold (PTh, cm of H₂O) that is required to initiate the voiding reflex are normally associated with the sensitive component of the micturition reflex (filling phase); conversely, the amplitude (A, cm of H₂O) and the duration (Δt, s) of the voiding contractions are mostly associated with the motor component of the micturition reflex (emptying phase). For the sake of clarity, the results presented in this study will consider in most instances the percent variation of ICI and Δt values as compared to the control situation achieved after six consecutive voiding contractions of similar amplitude. Test drugs were applied either into the bladder lumen (by changing the syringe connected to the automate perfusion pump, 0.04 ml min^{−1}) or intravenously through the catheter inserted into the left jugular vein.

2.3. Measurement of urinary ATP

For measuring urinary ATP content, samples were collected from the draining barrel of the catheter inserted in the bladder during *in vivo* fluid cystometry experiments. Sterile samples were immediately freeze-dried in liquid nitrogen and preserved at −80 °C until ATP determination (see, e.g. [9]). Undiluted samples were defrosted till 25 °C and afterwards centrifuged at 3000g at room temperature for 20 s. A mixture of luciferine–luciferase was added to the supernatant according to the manufacturer instructions (ATP Bioluminescence Assay Kit HS II, Roche Applied Science Indianapolis, Indiana, USA). Luminescence was detected using a microplate reader (Synergy HT, BioTek Instruments Inc., Vermont, USA). Sample bioluminescence was compared to external ATP standards prepared daily within the same concentration range. All samples were run in duplicate. Each sample remaining was used to quantify the LDH (LDH, EC 1.1.1.27) activity [23]. LDH is an intracellular enzyme which is commonly used as an indicator of cell integrity providing that its values are kept at a low level.

2.4. Real-time video-microscopy using propidium iodide to evaluate high molecular mass dye uptake via hemichannels

In this work, we monitored the uptake of propidium iodide by urothelial cells during agonist-induced hemichannels opening by real-time fluorescence video microscopy (see e.g. [19]). Due to its

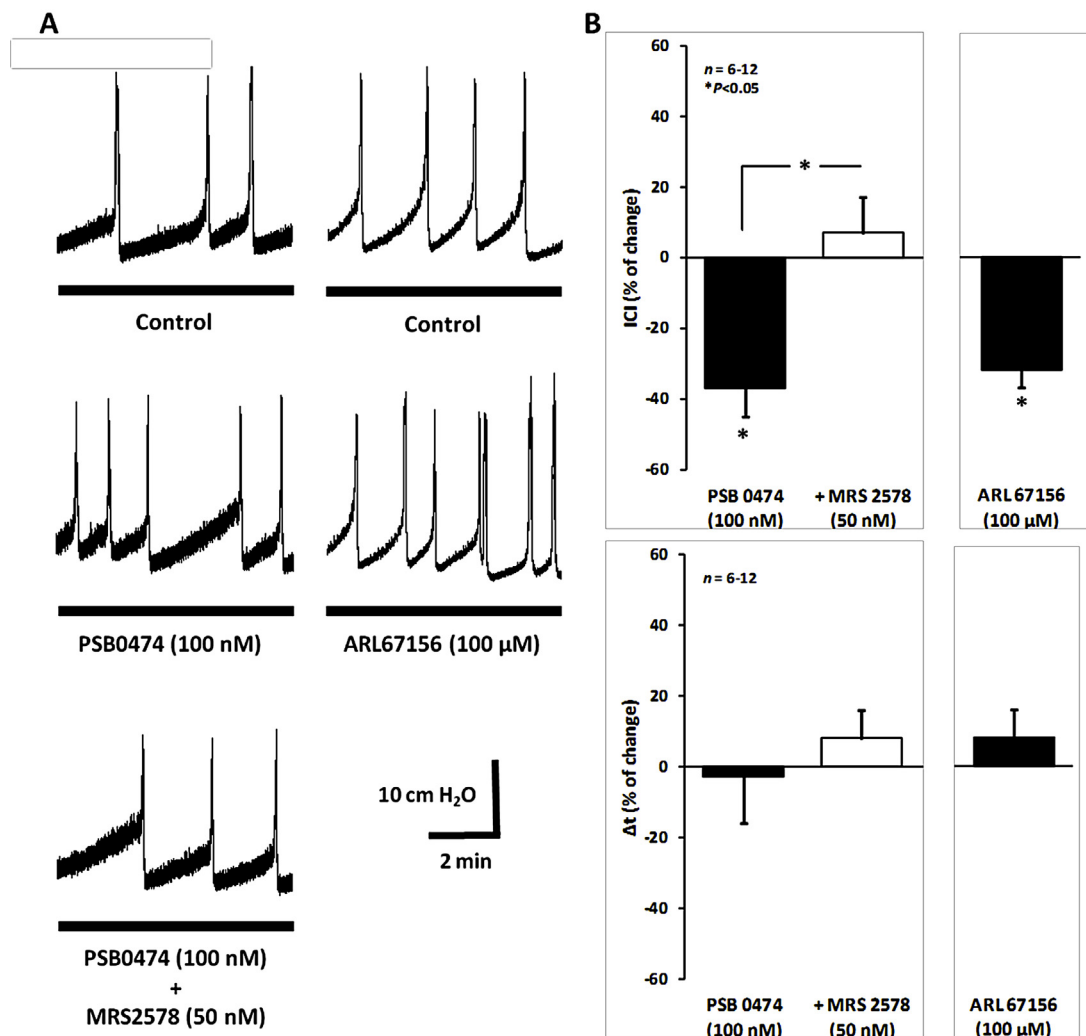
In vivo bladder cystometry

Fig. 1. Bladder cystometry recordings obtained during normal saline (0.90% w/v of NaCl) infusion into the urinary bladder of the anaesthetized rat: comparison of the effects of the P2Y₆ receptor agonist, PSB0474 (100 nM) and of the E-NTPDase inhibitor, ARL67156 (100 μM). Drugs were added to the saline infused into the bladder lumen used to induce the micturition reflex (see Section 2). In panel A, shown are stable urodynamic responses to PSB0474 and ARL67156 10–15 min after initiating the bladder perfusion with the drug. Note that application of the selective P2Y₆ receptor antagonist, MRS2578 (50 nM), together with PSB0474 (100 nM) reversed the agonist-induced increase in bladder activity to the control levels. In panel B, shown is the percent variation of the intercontraction interval (ICI) and of the duration (Δt) of voiding contractions as compared to control values (zero percent). In this situation, MRS2578 application (open bars) preceded that of PSB0474 (100 nM) by at least 20 min; this protocol allowed us to confirm that MRS2578 was used in a concentration (50 nM) that, on its own, was devoid of effect on any evaluated urodynamic parameter. The vertical bars represent SEM of an *n* number of animals. **P* < 0.05 (one-way ANOVA followed by Dunnett's modified *t* test) represents significant differences as compared to the control situation or to the effect of PSB0474 applied alone.

high molecular mass, propidium iodide (668.4 Da) is membrane impermeable and generally excluded from viable cells unless large diameter pores open. Propidium iodide becomes fluorescent (max. excitation ~535 nm, max. emission ~617 nm) when bound to nucleic acids. Therefore, increases in fluorescence intensity can be taken as measure of propidium iodide uptake into viable cells, which may occur in viable cells through connexin and pannexin-1 hemichannels.

Urinary bladder strips were pinned with the urothelium facing up in a 3-ml capacity Perspex chamber, heated to 37 °C, on the stage of an upright epifluorescence microscope (Zeiss Axiophot, Oberkochen, Germany). The preparations were allowed to equilibrate during 60 min (1 ml min⁻¹) with gassed (95% O₂ plus 5% CO₂) Tyrode's solution (pH 7.4) containing (mM): NaCl 137, KCl 2.7, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1, NaH₂PO₄ 0.4, NaHCO₃ 11.9, and glucose 11.2. From this time onwards, Tyrode's solution was supplemented with

calcium channel blockers, nifedipine (3 μM) and mibefradil (3 μM), to prevent smooth muscle spontaneous twitching under the microscope. Solutions and drugs were delivered using an automatic perfusion system (ValveLink8.2; Digitimer, Welwyn Garden City, UK) connected to a fast solution heating device (TC-344B; Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Germany).

Fluorescence images were acquired using a 63×/0.90 n.a. water immersion objective lens (Achromplan; Zeiss). Fluorescence excitation light came from a XBO 75W Xenon arc lamp via a BP 546/12 nm excitation filter; fluorescence emission was filtered with a LP 590 nm filter. Images were acquired in the time-lapse mode (once every 3 s) with a high-resolution cooled CCD camera (CoolSnap HQ, Roper Scientific Photometrics, Tucson, AZ, USA) connected to a computer running a digital image acquisition software (MetaFluor 6.3; Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA, USA). Exposure time was adjusted to 250 ms (binning and gain

Table 1
Primary and secondary antibodies used in immunohistochemistry experiments.

Primary antibodies				
Antigen	Code	Host	Dilution	Supplier
P2Y ₆	APR-011	Rabbit	1:150	Alomone
Connexin 43 (CX43)	ab11370	Rabbit	1:700	Abcam
Pannexin-1 (PANX1)	ab124131	Rabbit	1:1000	Abcam
Cytokeratin 20 (CK20)	M7019	Mouse	1:50	Dako
Secondary antibodies				
Antigen	Code	Host	Dilution	Supplier
Alexa Fluor 488 anti-rb	A-21206	Donkey	1:1500	Mol. Probes
Alexa Fluor 568 anti-ms	A-10037	Donkey	1:1500	Mol. Probes

were adjusted to 2). Regions of interest (in the urothelium) were manually outlined and the average intensity of the pixels inside this area was calculated. Results were expressed in fluorescence arbitrary units. Fifteen minute after adding propidium iodide (3 μ M) to the superfusion fluid a stable fluorescent signal in the urothelium was obtained.

2.5. Immunofluorescence staining and confocal microscopy observation

Excised bladder fragments were stretched to all directions, pinned onto Petri dishes coated with Sylgard and fixed in periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) solution for 16 h at 4 °C. Fixed tissue was cryoprotected with a solution containing 20% anhydrous glycerol dissolved in 0.1 M phosphate buffer, frozen, sectioned (16 μ m) and incubated with a blocking buffer solution consisting in foetal bovine serum 10%, bovine serum albumin 1%, Triton X-100 0.3% in phosphate buffered saline (PBS), for 2 h with constant stirring. After blocking and permeabilization, samples were incubated with selected primary antibodies (see Table 1) diluted in the incubation buffer (foetal bovine serum 5%, serum albumin 1%, Triton X-100 0.3% in PBS), at 4 °C, for 16 h. For double immunostaining, antibodies were combined before application to tissue samples. After washing away unbound primary antibody, the sections were incubated with secondary antibodies (Table 1) in the dark for 2 h, at room temperature. Finally, tissue samples were mounted on optical-quality glass slides using VectaShield with DAPI as mounting media (VectorLabs) and stored in the dark at 4 °C. Observations were performed and analyzed with a laser-scanning confocal microscope (Olympus Fluoview, FV1000, Tokyo, Japan).

2.6. Drugs and solutions

ARL67156 (6-*N,N*-diethyl-D- β , γ -dibromomethylene ATP trisodium salt), ATP, carbenoxolone, H1152 ((*S*)-(+)-2-methyl-1-[(4-methyl-5-iso-quinoliny]sulfonyl]-hexahydro-1*H*-1,4-diazepine dihydrochloride), mibefradil dihydrochloride, MRS2578 (*N,N'*-1,4-butanediylbis[*N'*-(3-isothiocyanatophenyl) thiourea], nifedipine, ¹⁰Panx (Panx-1 mimetic inhibitory peptide), PSB0474 (3-(2-oxo-2-phenylethyl)-uridine-5'-diphosphate disodium salt) were obtained from Tocris Bioscience (Bristol, UK); Foetal bovine serum, flufenamic acid, lysine, paraformaldehyde, sodium periodate and urethane were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA); Exo-1 (methyl 2-(4-fluorobenzamido) benzoate) and antibodies against connexin 43 (ab11370) and pannexin-1 (ab124131) were obtained from Abcam (Cambridge, UK); the P2Y₆ antibody (APR-011) was from Alomone Labs (Jerusalem, Israel); the cytokeratin 20 antibody (M7019) was from Dako (Glostrup, Denmark); Serum albumin and Triton X-100 were obtained from Merck (Darmstadt, Germany); Propidium iodide and secondary antibodies (Alexa Fluor 488

anti-rabbit and Alexa Fluor 568 anti-mouse) were from Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, USA). Luciferin-luciferase ATP bioluminescence assay kit HS II was purchased from Roche Applied Science (Indiana, USA). MRS2578, flufenamic acid, H1152, Exo-1 and nifedipine were diluted in dimethylsulphoxide (DMSO). ¹⁰Panx was made up in a 1.61 mM stock solution in 30% acetonitrile + 70% H₂O 1 M (v/v). PPADS and nifedipine were kept protected from light to prevent photodecomposition. Other drugs were prepared in saline (*in vivo* cystometric recordings) or in Tyrode's solution (*in vitro* experiments). All stock solutions were stored as frozen aliquots at –20 °C. Dilutions of these stock solutions were made daily and appropriate solvent controls were done. No statistically significant differences between control experiments, made in the absence or in the presence of the solvents at the maximal concentrations used (0.5% v/v), were observed.

2.7. Statistics

The values are expressed as mean \pm SEM, with *n* indicating the number of animals used for a particular set of experiments. Statistical analysis of data was carried out using paired or unpaired Student's *t*-test or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's modified *t*-test. *P* < 0.05 represents significant differences.

3. Results

In anaesthetized rats, instillation of the highly selective P2Y₆ receptor agonist, PSB0474 (100 nM) [14], into the bladder lumen decreased the intercontraction interval (ICI) and the pressure threshold (PTh) required to initiate the voiding reflex, respectively, by $37 \pm 8\%$ (*n* = 12) and $29 \pm 6\%$ (*n* = 12), without significantly affecting both the amplitude (A) and the duration (Δt) of voiding bladder contractions (Fig. 1). The selective non-competitive P2Y₆ receptor antagonist, MRS2578 (50 nM) [24], prevented PSB0474 (100 nM)-induced increase in the voiding frequency when the antagonist was applied either 15 min before (Fig. 1B) or after the effect of PSB0474 (100 nM) has been established (Fig. 1A). The increase in bladder activity caused by PSB0474 (100 nM) mimicked the effect of ARL67156 (100 μ M), an E-NTPDase inhibitor that is known to increase ATP levels in the bladder and, thereby, stimulate bladder activity [25,26] (Fig. 1).

Fig. 2 shows that intravesical PSB0474 (100 nM) increased by more than 3-fold the ATP content of the voided fluid collected during cystometry (Fig. 2), without significantly (*P* > 0.05) affecting the activity of the intracellular enzyme, LDH, in the same samples. LDH activity in the voided fluid under control conditions and after PSB0474 (100 nM) application was 7.3 ± 1.4 mU ml^{–1} (*n* = 5) and 8.0 ± 3.7 mU ml^{–1} (*n* = 5), respectively. For comparison purposes, we measured the ATP levels and LDH activity in the voided fluid after urothelial cells damage with acetic acid (2% v/v) during 15 min; as expected, the values obtained (115.0 ± 25.5 nM (*n* = 3) for ATP content and 21.0 ± 0.9 mU ml^{–1} (*n* = 3) for LDH activity) were significantly (*P* < 0.05) higher than those detected after application of the P2Y₆ receptor agonist. Overall, these findings suggest that ATP leak from damage cells does not account for the increase in the urinary nucleotide levels triggered by PSB0474 (100 nM). Blockade of P2Y₆ receptors with MRS2578 (50 nM) blunted augmentation of urinary ATP levels caused by PSB0474 (100 nM), without much affecting LDH activity (Fig. 2).

Given that the results described so far indicate that PSB0474 increase in the voiding frequency depends on P2Y₆ receptors activation leading to the release of ATP from intact urothelial cells, we tested the role of ATP releasing mechanisms like exocytosis-related trafficking and connexin- and pannexin-containing hemichannels on cystometry responses produced by PSB0474 using specific pharmacological inhibitors.

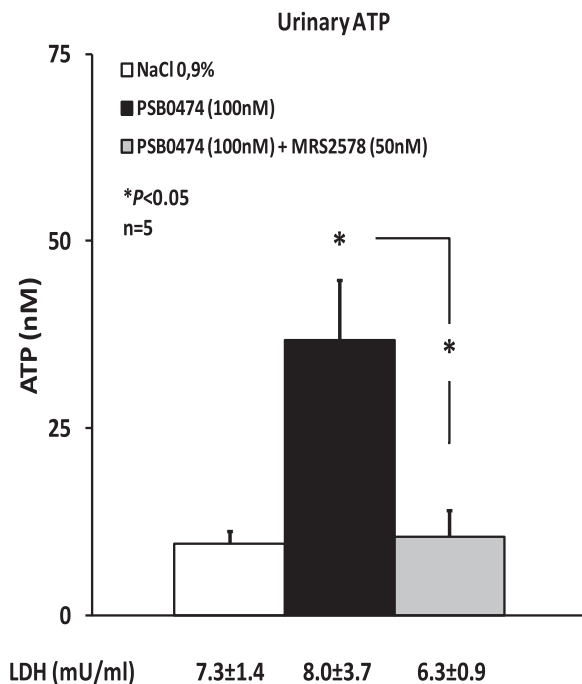


Fig. 2. Activation of P2Y₆ receptors with PSB0474 increases ATP levels in the voided fluid collected during cystometry recordings. The ATP content of the samples was quantified by the luciferin–luciferase bioluminescence assay. PSB0474 (100 nM) was added to the saline infused into the bladder lumen during cystometry recordings (see Section 2 and Fig. 1); application of the selective P2Y₆ receptor antagonist, MRS2578 (grey bar), preceded that of PSB0474 (100 nM) by at least 20 min. Please note that the activity of the intracellular enzyme, LDH, was not affected by PSB0474 (100 nM) in matched samples. The vertical bars represent SEM of an *n* number of animals. **P* < 0.05 (one-way ANOVA followed by Dunnett's modified *t* test) represents significant differences as compared with normal saline (0.90% w/v of NaCl) infusion or to the effect of PSB0474 applied alone.

Stretched-induced ATP release from the urinary bladder may reflect exocytosis-related trafficking of intracellular vesicles into the apical membrane of most superficial umbrella cells [27,28]. However, in our experimental conditions, infusion of the exocytosis inhibitor, Exo-1 (100 μM, *n* = 5), into the bladder lumen was virtually devoid of effect on the micturition reflex induced by saline bladder distension (Fig. 3). Exo-1 induces a rapid collapse of the Golgi to the endoplasmic reticulum, thus acutely inhibiting vesicular traffic and the exocytic pathway [29]. According with this, Exo-1 (100 μM) decreased by 79 ± 7% (*n* = 5) nerve-evoked [³H]-acetylcholine release from denuded (without the urothelium) rat bladder strips stimulated electrically (200 pulses of 0.2 ms duration delivered at 10-Hz frequency). The lack of Exo-1 effect on bladder urodynamics was also observed with brefeldin A (20 μM), another disruptor of membrane trafficking and vesicle exocytosis (reviewed in [30]). Instillation of brefeldin A (20 μM) into the bladder decreased ICI, and, Δ*t*, respectively, by 5 ± 3% (*n* = 3) and 9 ± 10% (*n* = 3) (data not shown).

The pannexin-1 mimetic inhibitory peptide, ¹⁰Panx (30 μM), as well as the preferential pannexin-1 inhibitor, carbenoxolone (CBX, 10 μM), were more effective than the connexin hemichannel blocker, flufenamic acid (FFA, 100 μM), at decreasing the voiding frequency in response to bladder distension in the anaesthetized rat (Fig. 3). These drugs affected the voiding frequency only when applied into the bladder lumen, but not when they were used intravenously at a higher concentration (e.g. 20 μM CBX). Hemichannel inhibitors did not affect significantly (*P* > 0.05) the amplitude (*A*) and the duration (Δ*t*) of the voiding bladder contractions (Fig. 3). The Rho kinase inhibitor, H1152 (1 μM), a compound that affects hemichannels pore permeability, also

decreased the voiding frequency in the anaesthetized rat, without affecting the amplitude (*A*) and the duration (Δ*t*) of voiding bladder contractions (Fig. 3). Given that H1152 (1 μM) might also interfere with CAM kinase II (IC₅₀ 0.180 μM) and protein kinase G (IC₅₀ 0.360 μM) activities, we tested the effect of H1152 in a lower concentration (10 nM) which selectively inhibits Rho kinase activity (IC₅₀ 0.012 μM) [31]. Instillation of H1152 (10 nM) into to the bladder lumen also decreased the ICI by 27 ± 3% (*n* = 4), without significantly affecting both the amplitude (*A*) and the duration (Δ*t*) of voiding bladder contractions.

When ¹⁰Panx (30 μM) and CBX (0.1 μM) were applied together with PSB0474 (100 nM) through the catheter inserted into the bladder, the P2Y₆ receptor agonist could no longer increase the voiding frequency observed in the control situation, i.e. in the absence of pannexin-1 inhibitors (Fig. 4). Close contact of hemichannel inhibitors with the urothelium may be a prerequisite for counteracting excitability produced by PSB0474 (100 nM), since intravenous infusion of a higher concentration (20 μM) of CBX was unable to affect the excitatory effect of the P2Y₆ receptor agonist (Fig. 4). Exo-1 (100 μM, *n* = 3), applied into the bladder lumen, was devoid of effect on PSB0474 (100 nM)-induced increase in the voiding frequency (data not shown).

Data presented in Fig. 5 show that perfusion of urinary bladder strips (urothelium facing up) *in vitro* with PSB0474 (100 nM) accelerated (*P* < 0.05) the uptake of propidium iodide into urothelial cells; the fluorescent dye uptake rate stabilized after washing out the P2Y₆ receptor agonist from the perfusion fluid. It is worth noting that spontaneous oscillations of urothelial dye spots significantly (*P* < 0.05) increased following PSB0474 application, despite supplementation of the Tyrode's solution with nifedipine (3 μM) and mibefradil (3 μM) to prevent smooth muscle twitching (Fig. 5A). This finding most likely denotes a microscopic contractile activity undertaken by suburothelial myofibroblasts. Blockade of P2Y₆ receptors or pannexin-1-containing hemichannels, respectively, with MRS2578 (50 nM) and CBX (100 nM) significantly (*P* < 0.05) decreased the rate (slope variation) of propidium iodide uptake by urothelial cells in the presence of PSB0474 (100 nM) as compared to the control situation (Fig. 5B). It is also worth noting that prevention of PSB0474 (100 nM)-induced propidium iodide dye uptake by MRS2578 (50 nM) correlates well with the blocking effect of this drug on ATP release produced by PSB0474 (100 nM) (see Fig. 2); likewise, CBX (100 nM) also reduced significantly (*P* < 0.05) the urinary ATP content from 37 ± 14 nM (*n* = 5) to 6 ± 4 nM (*n* = 3) in the presence of PSB0474 (100 nM).

The presence of P2Y₆ receptors in the rat urinary bladder was documented by immunofluorescence confocal microscopy (Fig. 6). Notably, P2Y₆ receptors are most abundantly expressed in the urothelium. Immunoreactivity against the P2Y₆ receptor was also observed in suburothelial myofibroblasts (cf. [11,13]). Pannexin-1 (Panx1) immunoreactivity labeled all layers of the urothelium including the terminally differentiated superficial umbrella cells marked with cytokeratin 20 (CK20) (Fig. 6). In contrast to the P2Y₆ receptor labeling, no specific staining with Panx1 antibody was observed in the suburothelial layer (Fig. 6). Conversely, the Cx43 antibody labeled more intensely the basal cell layer of the rat urothelium; Cx43 immunoreactivity also appears in cells of the suburothelial layer, which are presumably myofibroblasts (see e.g. [11,13]) (Fig. 6).

4. Discussion

This study provides compelling evidence that activation of P2Y₆ receptors increases bladder activity in the anaesthetized rat by favoring the release of ATP from the urothelium *via* pannexin-1 hemichannels. The P2Y₆ receptor agonist, PSB0474, mimicked the effect of intravesical ATP on bladder urodynamics (see Section 1, cf.

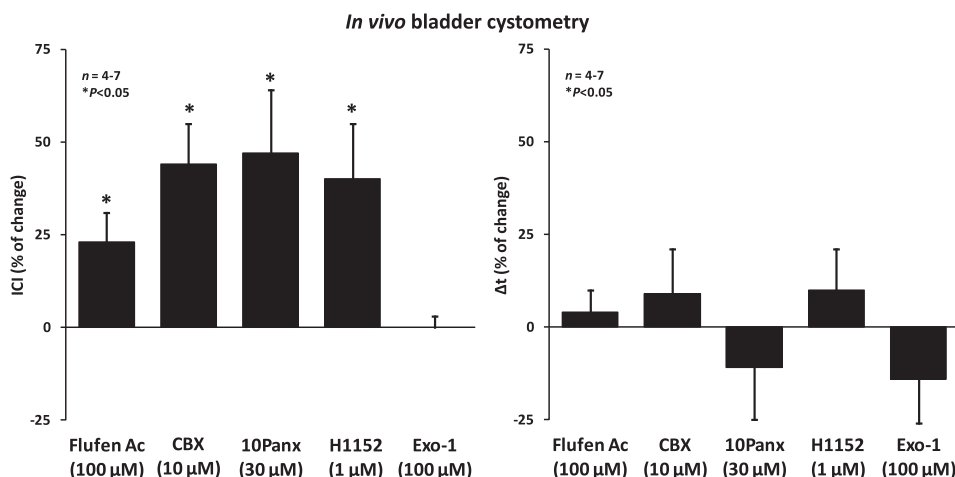


Fig. 3. Modifications of the urodynamic parameters in the anaesthetized rat by intravesical infusion of flufenamic acid (Flufen Ac, 100 μM), carbenoxolone (CBX, 10 μM), ¹⁰Panx (30 μM), H 1152 (1 μM) and Exo-1 (100 μM). Shown is the percent variation of the intercontraction interval (ICI) and of the duration (Δt) of voiding contractions as compared to control values (zero percent). The vertical bars represent SEM of an *n* number of animals. **P* < 0.05 (one-way ANOVA followed by Dunnet's modified *t* test) represents significant differences as compared to the control situation.

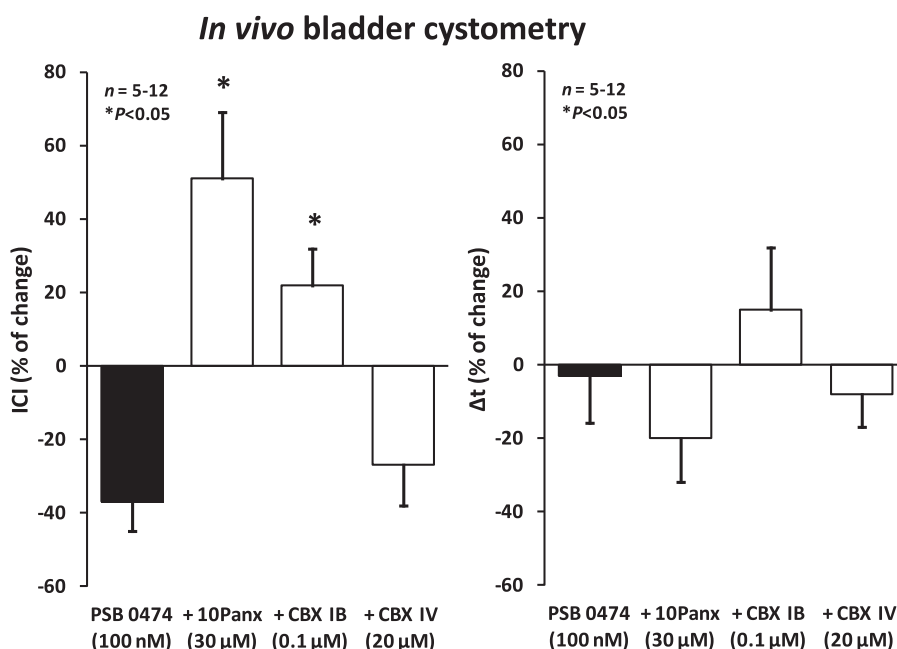


Fig. 4. Modifications of PSB0474-induced bladder overactivity by pannexin-1 inhibitors, ¹⁰Panx and carbenoxolone (CBX), in the anaesthetized rat. PSB0474 (100 nM) was added to the saline infused into the bladder lumen either in the absence or in the presence of ¹⁰Panx (30 μM) and CBX (0.1 μM). The effect of CBX (20 μM) was also tested when this drug was administered intravenously (IV) through the catheter inserted into the left jugular vein. Shown is the percent variation of the intercontraction interval (ICI) and of the duration (Δt) of voiding contractions as compared to control values (zero percent). The vertical bars represent SEM of an *n* number of animals. **P* < 0.05 (one-way ANOVA followed by Dunnet's modified *t* test) represents significant differences as compared to the effect of PSB0474 applied alone.

[6]) and reproduced bladder overactivity caused by the E-NTPDase inhibitor, ARL67156 [25,26]. Despite the expression of UTP-sensitive P2Y₂ (and P2Y₄) receptors have been shown by real-time PCR, Western blotting and immunocytochemistry in cultured urothelial cells of the rat bladder (see e.g. [10]), activation of these receptors might play a minor role in the intact organ. This was assumed because bladder overactivity produced by PSB0474, as well as by UTP and UDP (unpublished observations), was fully blocked by MRS2578, a non-competitive selective P2Y₆ receptor antagonist that displays no activity at P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ and P2Y₁₁ receptors at concentrations below 10 μM [24]. Given that PSB0474 infused into the bladder lumen exerted a more prominent role on the storage phase (ICI and PTh), rather than on the voiding component (A and Δt), of the micturition cycle one may assume

that the urothelium and/or the suburothelial layer, including afferent nerves and/or myofibroblasts, are the most likely targets for P2Y₆ receptor activation. The increase in the voiding frequency caused by luminal PSB0474 might be undertaken by the sequential activation of urothelial P2Y₆ receptors and ATP release leading to stimulation of ionotropic P2X₃ receptors on suburothelial sensory nerve fibers [1,2]. Direct activation of detrusor smooth muscle via co-expressed P2Y₆ and P2X₁ receptors [12] may, thus, represent a minor component of the UDP-sensitive urodynamic response in the anaesthetized rat.

In fact, we demonstrated here by confocal microscopy that P2Y₆ receptor immunoreactivity is most abundantly expressed in the urothelium of the rat urinary bladder (see also, [13]), although it has also been found in suburothelial myofibroblasts and in the

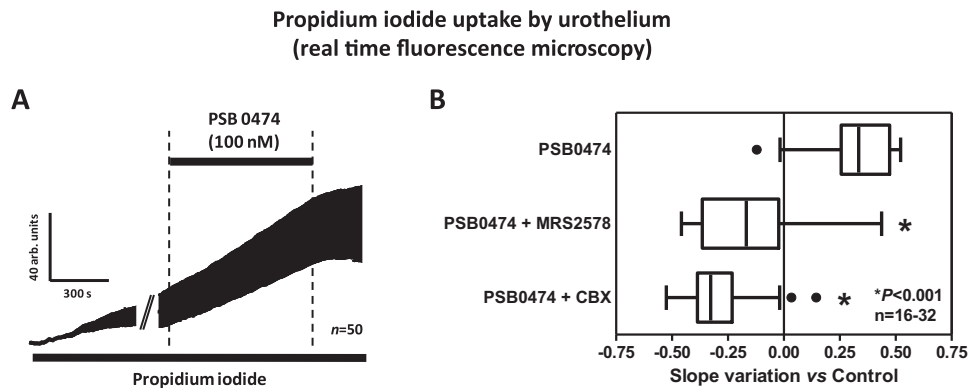


Fig. 5. Measurement of propidium iodide uptake by urothelial cells of isolated bladder strips *in vitro* using real time fluorescence microscopy. In panel A, represented is the fluorescence variation in the urothelium during continuous perfusion of propidium iodide (black bar at the bottom of the graph). The black bar between the vertical dashed lines at the top of the graph indicates the time of PSB0474 (100 nM) application, either alone or in association with MRS2578 (50 nM) and carbenoxolone (CBX, 0.1 μ M). Results are in arbitrary units of fluorescence. Panel B, shows a “Box & whiskers” representation of the effect of PSB0474 (100 nM) assessed by comparing the slope variation of propidium dye uptake in control conditions and in the presence of MRS2578 (50 nM) and carbenoxolone (CBX, 0.1 μ M). Represented is pooled data from an n number of regions of interest (ROIs) from a total of 4 independent experiments (animals). Zero represents identity between the two values (drug vs. control); positive and negative values represent facilitation or inhibition of the dye uptake compared to the control situation. * $P < 0.001$ (one-way analysis of variance followed by Dunnett’s modified t -test) represents significant differences when compared to PSB0474 alone.

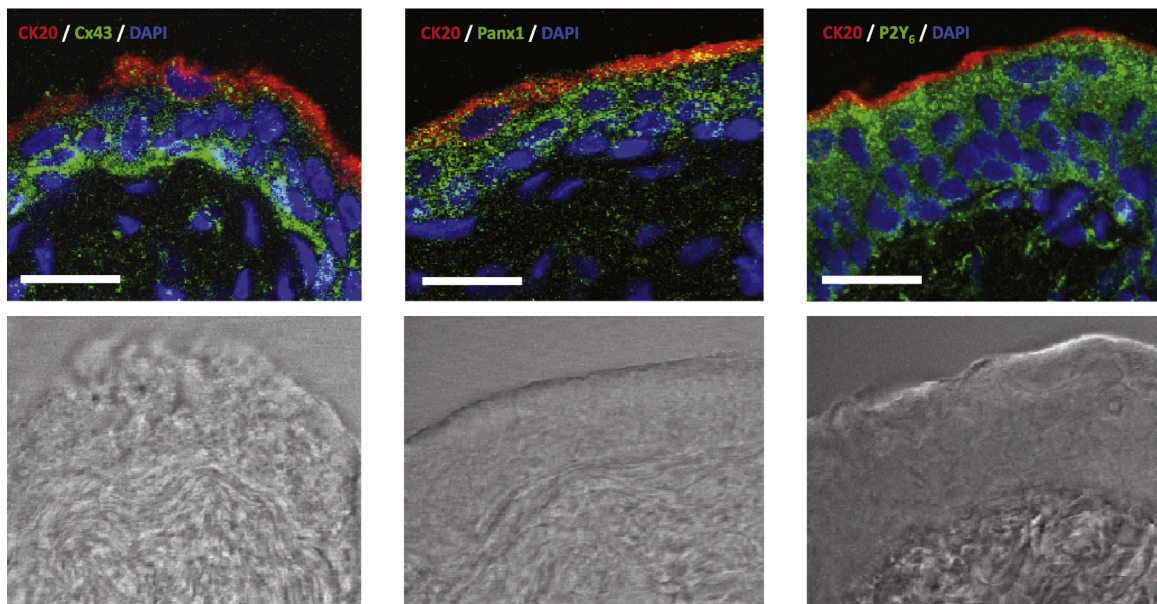


Fig. 6. Confocal micrographs comparing the immunolocalization of connexin 43, pannexin-1 and P2Y₆ receptor (green) in the urothelium and suburothelial layer of the rat urinary bladder. Terminally differentiated urothelial cells (umbrella cells) are marked with cytokeratin 20 (CK20, red); Nuclei are stained with DAPI (blue). Yellow staining denotes co-localization of pannexin-1 or P2Y₆ receptor (green) with CK20 (red). Differential interference contrast (DIC) images are shown for comparison (bottom panels). Scale bars = 50 μ m.

detrusor muscle layer (cf. [11,13]). The P2Y₆ receptor staining in the urothelium spans from the basal layer to the terminally differentiated umbrella cells. A similar pattern was observed for pannexin-1 immunoreactivity. Thus, our findings resolved the distribution of pannexin-1 hemichannels in the urinary bladder, one of the tissues expressing the highest amounts of pannexin-1 mRNA in the body [16]. Unlike pannexin-1, Cx43 immunoreactivity was most abundant in the basal layer of the urothelium and presumably in myofibroblasts of the suburothelial layer.

To our knowledge this is the first report showing that pannexin-1 (and also Cx43) containing hemichannels contribute to urothelial ATP release triggered by physiological bladder distension. Data suggest that ATP-releasing pannexin-1-forming hemichannels might have a more prominent role than Cx43 channels in controlling the voiding frequency to bladder distension in the anesthetized rat. This was assumed based on the findings that the

pannexin-1 mimetic inhibitory peptide, ¹⁰Panx, and the preferential pannexin-1 inhibitor, CBX, were more effective than flufenamic acid, an inhibitor of connexin-containing channels, in decreasing the voiding frequency induced by bladder distension. Partial impairment of ATP release by flufenamic acid was also reported in the distended mucosal surface of the rabbit urothelium [32]. Involvement of ATP release by vesicle exocytosis was discarded since two inhibitors of vesicular traffic and the exocytic pathway, Exo-1 and brefeldin A, were virtually devoid of effect on any of the cystometric parameters analyzed. This finding agrees with previous studies demonstrating that urothelial-originated ATP is non-vesicular as it increases in the absence of Ca²⁺ [33]. Notwithstanding this, vesicular release of ATP from the urothelium has been reported in cats diagnosed with interstitial cystitis [34]. Whether vesicular ATP release becomes more relevant under pathological conditions, along with changes of P2 purinoceptors

expression [35], and/or this discrepancy is due to different species sensitivity, deserves to be further investigated.

The increase in bladder activity produced by PSB0474 was fully reversed when the selective P2Y₆ receptor agonist was applied together with ¹⁰Panx or CBX through the catheter inserted into the bladder lumen, but not when CBX was applied intravenously at a 200-fold higher concentration. Moreover, we showed that activation of P2Y₆ receptors enhanced by more than 3-fold ATP release into voided urinary fluid collected during cystometry assays, without significantly affecting the activity of the intracellular enzyme LDH in matched samples. Thus, under these circumstances, leak of ATP from damaged urothelial cells does not account for increased urinary levels of the nucleotide. The involvement of ATP releasing hemichannels was further confirmed by real-time fluorescence microscopy focused in the uptake of propidium iodide by urothelial cells. Activation of urothelial P2Y₆ receptors increased propidium iodide dye uptake, an effect that was significantly attenuated by blocking pannexin-1 hemichannels with a submicromolar concentration (0.1 μM) of CBX [36], thus implicating the opening of large membrane pores that facilitate translocation of high molecular mass and/or heavily charged molecules (like ATP and other nucleotides) between intra- and extracellular compartments.

Fry and co-workers showed that suburothelial myofibroblasts are supersensitive to stretch-released ATP from the urothelium giving rise to augmented intrinsic spontaneous contractions of the urinary bladder in spinal cord transected rats; an effect that may be blocked by the selective P2Y₆ receptor antagonist, MRS2578 (10 μM) [11]. Propagation of fluorescence Ca²⁺ and membrane potential waves originated in the suburothelium to the detrusor and urothelium may occur through gap junctions containing Cx43 [37,38]. Whilst this mechanism may be exaggerated in spinal cord transected rats due to increases in the number of myofibroblasts in the suburothelial space [11], as well as in the inflamed bladder where Cx43 expression significantly increases [39], circadian oscillations of Cx43 have been associated with the biological clock and contributes to diurnal changes in bladder capacity that avoids disturbance of sleep by micturition [40]. However, connexin-containing channels have (a) relatively short half life, (b) low open probability under normal conditions, because its activity decreases substantially by increasing extracellular Ca²⁺ levels above 500 nM, and (c) their permeability is severely affected by extracellular acidic conditions (commonly observed in urine) [41]. Unlike connexin hemichannels, pannexin-1 containing channels are not regulated by extracellular Ca²⁺, allowing these channels to open under physiological conditions [36]. The regulatory mechanisms upstream of pannexin-1-mediated ATP release involve mechanical stretch, membrane potential, cytoplasmic Ca²⁺ concentration [17,18], and RhoA/Rho kinase activation [19], besides the activation of purinoceptors [17,20–22]. Thus, immunohistochemical and functional data from this study support the notion that pannexin-1 channels may have a physiologically relevant role on ATP release in the rat urothelium.

The molecular mechanism(s) by which urothelial P2Y₆ receptors activation release ATP through the opening of pannexin-1 hemichannels deserves to be further investigated. Generation of inositol triphosphate by phospholipase C and, subsequent, Ca²⁺-recruitment from internal stores may be a putative underlying mechanism [42]. The P2Y₆ receptor, like other G_q-coupled receptors, may additionally stimulate Rho-GTPase (via G_{12/13}) acting to strongly potentiate the Ca²⁺-activated ATP release pathway [43,44]. Given the actions exerted by Rho/Rho kinase on scaffold proteins and cytoskeleton components (e.g. regulating myosin-light chain phosphorylation and actin polymerization), some authors speculate that Rho-promoted membrane-cytoskeleton rearrangements facilitate the opening and/or the insertion of hemichannel subunits within the plasma membrane. Blockade of one of these multiple mechanisms

might explain the attenuating effect of the Rho kinase inhibitor, H1152, on PSB0474-induced bladder overactivity.

Given that intracellular ATP levels are 10 to 50 times higher than the other purine or pyrimidine nucleoside triphosphate species (including UTP) it is not surprising that at sites of tissue injury micromolar concentrations of ATP may appear, which surpass the concentration of any other nucleotide. Nucleotides may also exist transiently in tissues microenvironment without cell damage, via two distinct nonlytic mechanisms: (a) exocytic release specifically concentrated within secretory granules or vesicles; and (b) release of cytosolic nucleotides via intrinsic plasma membrane channels or pores, which includes stretch-activated channels, ATP-binding cassette (ABC) transporters and gap junction-type hemichannels (reviewed in [15]). The ability of various cell types (e.g. murine airway epithelial cells, human cardiomyocytes), but so far none from the urinary tract, to release UTP has been directly confirmed [45,46]. Interestingly, mechanical stress appeared to be the major, if not the only, stimulus for cytosolic UTP release in nonsecretory tissues. Despite detection of pyrimidine nucleotides implicates a laborious methodological approach due to minute endogenous amounts of UTP compared to ATP complicated by the presence of ectoenzymes that rapidly degrade extracellular nucleotides, we are doing our best to define in future reports whether uracil nucleotides are released in parallel with ATP from the bladder urothelium. Nevertheless, it is important to stress that the extracellular accumulation of nucleotides such as UTP, UDP, and ADP may not necessarily involve a requirement for their selective release from intracellular pools. Rather, these nucleotides may accumulate as a secondary consequence of extracellular metabolism (degradation or synthesis) of nucleotide precursors that are directly released in various physiological or pathological conditions (reviewed in [47]). Thus, ADP or UDP may either be released directly or be generated via the extracellular hydrolysis of directly released ATP or UTP. It is also possible that extracellular UTP may be secondarily generated via an ecto-nucleoside diphosphokinase (NDPK)-mediated transphosphorylation of directly released UDP by ATP that is co-released from the same cell or released coincidently from adjacent cells (e.g. [48]).

Whilst the origin of uracil nucleotides in the urinary bladder remains controversial, we demonstrated here for the first time a role for the highly expressed UDP-sensitive P2Y₆ receptor in the urothelium. We concluded that, in the anaesthetized rat, the P2Y₆ receptor activation leads to increases in the voiding frequency (without much affecting the detrusor tension) indirectly by releasing ATP from the urothelium via pannexin-1 hemichannels. It remains to be elucidated whether this mechanism is exaggerated in overactive and/or painful bladder syndromes before assuming that a pharmacological intervention on these pathways might be beneficial.

Grants

This research was partially supported by Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT projects PTDC/SAU-OSM/104369/2008 and Pest/OE/UI0215/2011), Associação Portuguesa de Urologia and University of Porto/Caixa Geral de Depósitos (Investigação Científica na Pré-Graduação).

Acknowledgments

The authors wish to thank Drs Cátia Vieira and Catarina Baldaia for their collaboration in some *in vitro* experiments. We also thank Mrs. Maria Helena Costa e Silva and Belmira Silva for their valuable technical assistance.

References

- [1] Cockayne DA, Hamilton SG, Zhu QM, Dunn PM, Zhong Y, Novakovic S, et al. Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X₃-deficient mice. *Nature* 2000;407:1011–5.
- [2] Ito K, Iwami A, Katsura H, Ikeda M. Therapeutic effects of the putative P2X₃/P2X_{2/3} antagonist A-317491 on cyclophosphamide-induced cystitis in rats. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2008;377:483–90.
- [3] Burnstock G. Purinergic signalling in the lower urinary tract. *Acta Physiol* 2013;207:40–52.
- [4] Silva I, Correia J, Ferreirinha F, Magalhães-Cardoso MT, Silva-Ramos M, Sévigny J, et al. Bladder overactivity due to global impairment of ecto-NTPDases in humans with lower urinary tract disorders exhibiting unbalanced ATP/adenosine formation. *Auton Neurosci Basic Clin* 2011;163(1–2):49–50.
- [5] Fry CH, Sui GP, Kanai AJ, Wu C. The function of suburothelial myofibroblasts in the bladder. *Neurourol Urodyn* 2007;26:914–9.
- [6] Pandita RK, Andersson KE. Intravesical adenosine triphosphate stimulates the micturition reflex in awake, freely moving rats. *J Urol* 2002;168:1230–4.
- [7] Ruggieri Sr MR. Mechanisms of disease: role of purinergic signaling in the pathophysiology of bladder dysfunction. *Nat Clin Pract Urol* 2006;3:206–15.
- [8] Fry CH, Rossen A. Urothelial targets in the overactivity bladder. *J Urol Urogynaekol* 2007;1:20–3.
- [9] Silva-Ramos M, Silva I, Oliveira O, Ferreira S, Reis MJ, Oliveira JC, et al. Urinary ATP may be a dynamic biomarker of detrusor overactivity in women with overactive bladder syndrome. *PLoS One* 2013;8(May 31, 2013):e64696. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0064696>.
- [10] Chopra B, Geveer J, Barrick SR, Hanna-Mitchell AT, Beckel JM, Ford AP, et al. Expression and function of rat urothelial P2Y receptors. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;294:F821–9.
- [11] Fry CH, Young HS, Jabr RI, McCarthy C, Ikeda Y, Kanai AJ, et al. Modulation of spontaneous activity in the overactive bladder: the role of P2Y agonists. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012;302:F1447–54.
- [12] Yu W, Sun X, Robson SC, Hill WG. Extracellular UDP enhances P2X-mediated bladder smooth muscle contractility via P2Y₆ activation of the phospholipase C/inositol trisphosphate pathway. *FASEB J* 2013;27:1895–903.
- [13] Sui GP, Wu C, Fry CH. Characterization of the purinergic receptor subtype on guinea-pig suburothelial myofibroblasts. *BJU Int* 2006;97:1327–31.
- [14] El-Tayeb A, Qi A, Müller CE. Synthesis and structure-activity relationships of uracil nucleotide derivatives and analogues as agonists at human P2Y₂, P2Y₄, and P2Y₆ receptors. *J Med Chem* 2006;49:7076–87.
- [15] Burnstock G. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacol Rev* 2006;58:58–86.
- [16] Hanstein R, Negoro H, Patel NK, Charollais A, Meda P, Spray DC, et al. Promises and pitfalls of a Pannexin-1 transgenic mouse line. *Front Pharmacol* 2013;4:61. <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2013.00061>.
- [17] Bao L, Locovei S, Dahl G. Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS Lett* 2004;572:65–8.
- [18] Locovei S, Wang J, Dahl G. Activation of pannexin-1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. *FEBS Lett* 2006;580:239–44.
- [19] Seminario-Vidal L, Okada SF, Sesma JL, Kreda SM, van Heusden CA, Zhu Y, et al. Rho signaling regulates pannexin-1-mediated ATP release from airway epithelia. *J Biol Chem* 2011;286:26277–86.
- [20] Locovei S, Scemes E, Qiu F, Spray DC, Dahl G. Pannexin-1 is part of the pore forming unit of the P2X₇ receptor death complex. *FEBS Lett* 2007;581:483–8.
- [21] Pelegrin P, Surprenant A. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 beta release by the ATP-gated P2X₇ receptor. *EMBO J* 2006;25:5071–82.
- [22] Qiu F, Dahl G. A permeant regulating its permeation pore: inhibition of pannexin-1 channels by ATP. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009;296:C250–5.
- [23] Keiding R, Hørde M, Gerhard W, Denmark E. Recommended methods for the determination of four enzymes in blood. *Scand J Clin Lab Invest* 1974;1:271–4.
- [24] Mamedova LK, Joshi BV, Gao ZG, von Kügelgen I, Jacobson KA. Diisothiocyanate derivatives as potent, insurmountable antagonists of P2Y₆ nucleotide receptors. *Biochem Pharmacol* 2004;67:1763–70.
- [25] Westfall TD, Kennedy C, Sneddon P. The ecto-ATPase inhibitor ARL 67156 enhances parasympathetic neurotransmission in the guinea-pig urinary bladder. *Eur J Pharmacol* 1997;329:169–73.
- [26] Harvey RA, Skennerton DE, Newgreen D, Fry CH. The contractile potency of adenosine triphosphate and ecto-adenosine triphosphatase activity in guinea pig detrusor and detrusor from patients with a stable, unstable or obstructed bladder. *J Urol* 2002;168:1235–9.
- [27] Truschel ST, Wang E, Ruiz WG, Leung SM, Rojas R, Lavelle J, et al. Stretch-regulated exocytosis/endocytosis in bladder umbrella cells. *Mol Biol Cell* 2002;13:830–46.
- [28] Yu W, Khanderwal P, Apodaca G. Distinct apical and basolateral membrane requirements for stretch-induced membrane traffic at the apical of bladder umbrella cells. *Mol Biol Cell* 2009;20:282–95.
- [29] Feng Y, Yu S, Lasell TK, Jadhav AP, Macia E, Chardin P, et al. Exo1: a new chemical inhibitor of the exocytic pathway. *PNAS* 2003;100:6469–74.
- [30] Klausner RD, Donaldson JG, Lippincott-Schwartz J, Brefeldin A. Insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol* 1992;116:1071–80.
- [31] Shum WW, Le GY, Jones RL, Gurney AM, Sasaki Y. Involvement of Rho-kinase in contraction of guinea-pig aorta induced by prostanoid EP₃ receptor agonists. *Br J Pharmacol* 2003;139:1449–61.
- [32] Wang EC, Lee JM, Ruiz WG, Balestreire EM, von Bodungen M, Barrick S, et al. ATP and purinergic receptor-dependent membrane traffic in bladder umbrella cells. *J Clin Invest* 2005;115:2412–22.
- [33] Ferguson DR, Kennedy I, Burton TJ. ATP is released from rabbit urinary bladder epithelial cells by hydrostatic pressure changes—a possible sensory mechanism? *J Physiol (London)* 1997;505:503–11.
- [34] Birder LA, Barnick SR, Rappolo JR, Kanai AJ, de Groat WC, Kiss S, et al. Feline interstitial cystitis results in mechanical hypersensitivity and altered ATP release from bladder urothelium. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285:F423–9.
- [35] Birder LA, Ruan HZ, Chopra B, Xiang Z, Barrick S, Buffington CA, et al. Alterations in P2X and P2Y purinergic receptor expression in urinary bladder from normal cats and cats with interstitial cystitis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;287:F1084–91.
- [36] Bruzzone R, Barbe MT, Jakob NJ, Monyer H. Pharmacological properties of homomeric and heteromeric pannexin hemichannels expressed in *Xenopus* oocytes. *J Neurochem* 2005;92:1033–43.
- [37] Sui GP, Rothery S, Dupont E, Fry CH, Severs NJ. Gap junctions and connexin expression in human suburothelial interstitial cells. *BJU Int* 2002;90:118–29.
- [38] Wang HZ, Brink PK, Christ GJ. Gap junction channel activity in short-term cultured human detrusor myocyte cell pairs: gating and unitary conductances. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;291:C1366–76.
- [39] Li K, Yao J, Shi L, Sawada N, Chi Y, Yan Q, et al. Reciprocal regulation between proinflammatory cytokine-induced inducible NO synthase (iNOS) and connexin 43 in bladder smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2011;286:41552–62.
- [40] Negoro H, Kanematsu A, Doi M, Suadcani SO, Matsuo M, Imamura M, et al. Involvement of urinary bladder connexin 43 and the circadian clock in coordination of diurnal micturition rhythm. *Nat Commun* 2012;3(May 1, 2012):809. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms1812>.
- [41] De Vuysta E, Wanga N, Decrocka E, De Bocka M, Vinkenb M, Van Moorhemma M, et al. Ca²⁺ regulation of connexin 43 hemichannels in C6 glioma and glial cells. *Cell Calcium* 2009;46:176–87.
- [42] Iglesias R, Dahl G, Qiu F, Spray DC, Scemes E. Pannexin-1: the molecular substrate of astrocyte hemichannels. *J Neurosci* 2009;29:7092–7.
- [43] Blum AE, Joseph SM, Przybylski RJ, Dubyak GR. Rho-family GTPases modulate Ca(2+)-dependent ATP release from astrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008;295:C231–41.
- [44] Seminario-Vidal L, Kreda S, Jones L, O'Neal W, Trejo J, Boucher RC, et al. Thrombin promotes release of ATP from lung epithelial cells through coordinated activation of Rho- and Ca²⁺-dependent signaling pathways. *J Biol Chem* 2009;284:20638–48.
- [45] Lazarowski ER, Homolya L, Boucher RC, Harden TK. Direct demonstration of mechanically induced release of cellular UTP and its implication for uridine nucleotide receptor activation. *J Biol Chem* 1997;272:24348–54.
- [46] Lazarowski ER, Boucher RC, Harden TK. Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Mol Pharmacol* 2003;64:785–95.
- [47] Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 2008;1783:673–94.
- [48] Lazarowski ER, Boucher RC, Harden TK. Constitutive release of ATP and evidence for major contribution of ecto-nucleotide pyrophosphatase and nucleoside diphosphokinase to extracellular nucleotide concentrations. *J Biol Chem* 2000;275:31061–68.